

# **Epigenetische Regulation der Hepatischen Sternzell-Aktivierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Eva Christine Schumacher, geborene Quenkert**  
aus Soest

Soest, November 2018

aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
des Universitätsklinikums  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Professor Dr. Dieter Häussinger
2. Professor Dr. Eckard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2019

**Auszüge aus dieser Arbeit wurden in folgenden Originalarbeiten veröffentlicht:**

Götze, S., Schumacher, E.C., Kordes, C., Häussinger, D. (2015): Epigenetic changes during hepatic stellate cell activation. *PLoS One*, 10. e0128745.

Eigenanteil Eva Schumacher: Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext

Schumacher, E., Götze, S., Kordes, C., Benes, V., Häussinger, D. (2017): Combined methylome and transcriptome analysis during rat hepatic stellate cell activation. *Stem Cells Dev.* doi: 10.1089/scd.2017.0128.

Eigenanteil Eva Schumacher: Planung der Experimente, Durchführung der Experimente, Auswertung der Ergebnisse, Erstellung und Überarbeitung des Manuskripts nach Revision.

# Inhalt

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>III</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan .....	1
1.2 Leberfibrose .....	1
1.3 Hepatische Sternzellen.....	1
1.4 Epigenetik.....	4
1.4.1 DNA-Methylierung.....	5
1.4.2 DNA-Methylierung und Genexpression.....	5
1.4.3 Weitere Funktionen der DNA-Methylierung .....	6
1.4.4 DNA-Methylierungs- und –Demethylierungsprozesse .....	7
1.5 Dynamik der DNA-Methylierung während der Entwicklung.....	10
1.6 Epigenetische Veränderungen während der HSZ-Aktivierung.....	11
1.7 Fragestellung und Zielsetzung.....	13
<b>2 Materialien</b> .....	<b>15</b>
<b>3 Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1 Isolation und Kultur der Hepatischen Sternzellen.....	25
3.2 Untersuchung der DNA-Methylierung .....	26
3.2.1 Globale DNA-Methylierung.....	26
3.2.2 Genomweite DNA-Methylierung.....	26
3.2.3 Genspezifische DNA-Methylierung.....	27
3.2.4 Bestimmung der DNA-Methylierung in repetitiven Elementen .....	28
3.3 Untersuchung der Genexpression.....	29
3.3.1 Gen-Expressionsarray.....	29
3.3.2 RNA-Qualitätsanalyse .....	30
3.3.3 Quantitative PCR (qPCR) .....	30
3.4 <i>Gene ontology</i> (GO)- Analyse .....	32
3.5 Proteinanalysen.....	32
3.5.1 Immunfluoreszenz .....	32
3.5.2 Western Blot Analysen .....	33
3.6 BrdU-Zellproliferationassay.....	34
3.7 Statistik.....	35
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
4.1 Globale Dynamik der DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung .....	36
4.2 Genomweite Dynamik der DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung.....	37
4.3 <i>Gene ontology</i> (GO)-Analyse .....	40
4.4 Dynamik der Genexpression während der HSZ-Aktivierung.....	41

---

4.4.1	Qualitätsanalyse der <i>Array</i> daten .....	41
4.4.2	Differentielle Genexpression während der HSZ-Aktivierung.....	44
4.5	Korrelationsanalyse DNA-Methylierung und Genexpression während der HSZ-Aktivierung ..	47
4.6	Epigenetische Regulation spezifischer Gene während der HSZ-Aktivierung .....	48
4.6.1	Dtx4 während der HSZ-Aktivierung .....	49
4.6.2	Wt1 während der HSZ-Aktivierung .....	49
4.6.3	Gene mit differentieller Promotermethylierung .....	52
4.6.4	Gene mit differentieller Genkörpermethylierung .....	54
4.7	Der Notch-Signalweg während der HSZ-Aktivierung .....	57
4.8	DNA-Methylierung repetitiver Elemente während der HSZ-Aktivierung.....	59
4.9	Mechanismus der aktiven DNA-Demethylierung in HSZ.....	60
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>68</b>
5.1	Veränderung der globalen DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung.....	68
5.2	Veränderung der genomweiten DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung .....	71
5.3	DNA-Methylierungs- und Genexpressionsänderungen während der HSZ-Aktivierung.....	73
5.4	Genspezifische Analyse der DNA-Methylierungs- und Genexpressionsveränderungen .....	75
5.5	Abschließende Beurteilung und weiterführende Experimente .....	83
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>106</b>
	<b>Publikationen und Posterbeiträge.....</b>	<b>107</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>109</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>110</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>111</b>

## Zusammenfassung

Hepatische Sternzellen (HSZ) sind vor allem für ihre Beteiligung an der Leberfibrose bekannt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass HSZ mesenchymale Stammzellen der Leber sind, die über die Freisetzung von Botenstoffen und Zelldifferenzierung zur Leberregeneration beitragen können. Eine wichtige Rolle im Rahmen von Differenzierungsprozessen spielen epigenetische Mechanismen, die an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Dazu wird auch die DNA-Methylierung gezählt.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Dynamik der DNA-Methylierung während des Aktivierungsprozesses der HSZ zu untersuchen, um ihre Rolle in der Regulation dieser adulten Stammzelle zu ergründen. Zunächst wurde festgestellt, dass während der HSZ-Aktivierung eine starke globale DNA-Demethylierung um 60% stattfand, wie sie bereits aus der frühen Embryonalentwicklung bekannt ist. Die kodierenden Genombereiche wiesen hingegen mehrheitlich eine Hypermethylierung auf, daher wurde die starke DNA-Demethylierung außerhalb der kodierenden Bereiche des Genoms vermutet. Die Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid (CpG)-Methylierung repetitiver Elemente der DNA blieb unverändert. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die DNA-Demethylierung in Nicht-CpG-Sequenzen stattfindet, ein Mechanismus, der bereits mit der Regulation von Pluripotenz in Verbindung gebracht wurde.

Über Hemmung der Replikation mittels L-Mimosin wurde gezeigt, dass die DNA-Demethylierung über einen aktiven Mechanismus vermittelt wird. Diverse Gene, die während der Aktivierung differentiell exprimiert wurden, deuten eine DNA-Demethylierung über den Basen-Exzision-Reparaturmechanismus (BER) an, der genaue Mechanismus muss allerdings noch identifiziert werden. In den kodierenden Bereichen des Genoms traten vor allem Hypermethylierungen in Intron- und Exonbereichen auf, wohingegen Promoterbereiche nur einen geringen Anteil an den differentiell methylierten Regionen ausmachten. Die deutlichen Veränderungen der DNA-Methylierung spiegelten sich auch in einer starken Dynamik der Genexpression wieder. Im Verlauf der HSZ-Aktivierung wurden mehr Gene verstärkt als vermindert exprimiert. Während Promotermethylierungen mit der Genexpression negativ korrelierten, konnte für die DNA-Methylierung im Genkörper und die Expression keine Korrelation herausgearbeitet werden. Von der epigenetischen Regulation waren neben den Genen, die bekannte Prozesse der HSZ-Aktivierung regulieren, auch zahlreiche Gene mit einer Funktion im Rahmen von Differenzierungsprozessen betroffen. Hierzu gehörten auch Gene konservierter und mit der Entwicklung verbundener Signalwege wie Notch und Wnt.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit die Bedeutung epigenetischer Mechanismen, wie der DNA-Methylierung, für die HSZ-Aktivierung herausarbeiten und weitere Hinweise liefern, welche die Rolle der HSZ als adulte mesenchymale Stammzelle der Leber unterstützen.

## Abstract

Hepatic stellate cells (HSC) are mainly known for their contribution to liver fibrosis. More recent studies characterized HSC as mesenchymal stem cells that contribute to liver regeneration via secretion of supportive factors and cell differentiation. Diverse epigenetic mechanisms have an important role for developmental processes, because they regulate gene expression. One important epigenetic mechanism is DNA methylation.

This study investigated the dynamics of DNA methylation during HSC activation to elucidate the role of epigenetic modifications in HSC function as adult liver stem cells. During HSC activation, a global DNA demethylation of 60% was found in reminiscence of early embryology. The site of DNA demethylation was not associated with coding regions of the DNA, because genes rather exhibited hypermethylation. CpG methylation of repetitive DNA elements remained unchanged. Therefore, future studies should address, if the DNA demethylation involves nucleobases apart from cytosin, a process that has been associated with the regulation of pluripotency.

Inhibition of replication with L-Mimosine could demonstrate, that the DNA in activating HSC was demethylated via an active mechanism. Diverse genes with differential expression during HSC activation indicated a base excision repair assisted DNA demethylation. However, the exact mechanism remains to be identified.

Most notably, hypermethylation was found in the intronic and exonic regions of the genome, whereas promoter regions represented only a small part of differentially methylated regions. Pronounced changes in DNA methylation during HSC activation were accompanied by great dynamics in gene expression. During this process a higher number of genes showed an increased rather than a decreased expression. While promoter methylation correlated negatively with gene expression, this study could not work out a clear correlation between gene body methylation and gene expression. Epigenetic regulation affected the expression of genes known to be altered during HSC activation, but also a notable number of genes known to be involved in cell differentiation. This includes genes of conserved signaling pathways such as Notch and Wnt, known to guide developmental processes of stem cells.

Taken together, this study indicated the importance of epigenetic mechanisms such as DNA methylation for HSC activation and revealed new hints to support the role of HSC as adult mesenchymal stem cells of the liver

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan

Die Leber nimmt unter den Organen eine zentrale Stellung ein, da sie viele Funktionen erfüllt, die für die Integrität des Körpers und zentrale Stoffwechselabläufe unbedingt notwendig sind. Zu ihren Aufgaben gehören unter anderem die Speicherung und Bereitstellung von Glukose, die Biosynthese von Lipiden und Ketonkörpern, Synthese von zahlreichen Plasmaproteinen, der Abbau von Endo- und Xenobiotika sowie die Synthese der Galle (Häussinger & Löffler, 2014). Aus diesen vielfältigen Aufgaben ergibt sich die Notwendigkeit einer gesunden, funktionellen Leber.

## 1.2 Leberfibrose

Die Leber hat generell eine sehr hohe Regenerationsfähigkeit, sodass geringfügige akute Leberschädigungen gut ausgeglichen werden können. Bei chronischen Leberschädigungen kann es hingegen zur Ausbildung einer Leberfibrose kommen. Chronischen Leberschädigungen können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. So können beispielsweise Virusinfektionen, Alkohol- oder Medikamenteneinfluss, aber auch die Ausbildung einer Fettleber zur Entstehung der Fibrose beitragen. Die Fibrose ist gekennzeichnet durch die vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix (EZM) im Lebergewebe. Bei einem Voranschreiten der Fibrose kann es zur Ausbildung einer Leberzirrhose und einem vermehrten Absterben von Hepatozyten sowie zum Verlust der ursprünglichen Leberarchitektur kommen, sodass die Leber ihre wichtigen Funktionen nicht mehr aufrechterhalten kann. Eine Leberzirrhose kann im weiteren Verlauf der Krankheit die Ursache für ein Leberzellkarzinom sein (Friedman, 2003, Häussinger & Löffler, 2014). Die Fettleber ist gegenwärtig ein schwerwiegendes Problem der Industrienationen. Schon 2014 waren 39% der Erwachsenen weltweit übergewichtig und 13% davon sogar adipös, das heißt, sie wiesen einen Body Mass Index (BMI) von über 30 auf und waren damit deutlich übergewichtig (Daten Weltgesundheitsorganisation, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>). Daher sind genaue Kenntnisse über die Ätiologie der Leberfibrose und Therapieverfahren zur Behandlung der Erkrankung dringend erforderlich. Nach derzeitigem Kenntnisstand sind hepatische Sternzellen maßgeblich an der Entstehung der Leberfibrose beteiligt (Friedman *et al.*, 1985; Friedman, 2008).

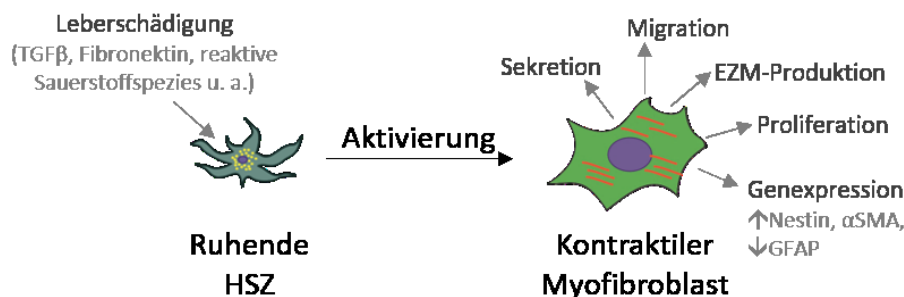
## 1.3 Hepatische Sternzellen

Die HSZ gehören zu den nicht-parenchymalen Zellen der Leber. Die von Professor Carl Wilhelm von Kupffer 1876 erstmalig beschriebenen (Kupffer, 1876) und auch als Ito-Zellen, Lipozyten oder Perisinusoidalzellen bezeichneten HSZ liegen in der physiologischen Leber in einem ruhenden Zustand vor. Dieser ist im Rattenmodell vor allem durch die Expression von Desmin und *glial fibrillary acidic*



*protein* (GFAP) (Gard *et al.*, 1985; Yokoi *et al.*, 1984) gekennzeichnet, zwei Klasse-III-Intermediärfilamente, die ursprünglich aus Astrozyten bzw. Muskelzellen bekannt sind. Ruhende Sternzellen zeichnen sich ferner durch viele zytoplasmatische Lipidtropfen aus, in denen Retinoide gespeichert sind (Wake, 1971). In der Leber sind ruhende HSZ im Disseschen Raum lokalisiert (Friedman, 2008). Dies ist ein Spalt zwischen der basolateralen Seite der Hepatozyten und den sinusoidalen Endothelzellen (SEZ), der Basalmembranproteine enthält.

Bei einer Leberschädigung kommt es zu einer Aktivierung der ruhenden HSZ, dieser Aktivierungsprozess geht mit zahlreichen morphologischen und funktionellen Änderungen einher. Phänotypisch entwickeln die HSZ sich dann zu kontraktile Myofibroblasten (Rockey & Weisiger, 1996), dies spiegelt sich auch in der verstärkten Expression von  $\alpha$ -smooth muscle-actin ( $\alpha$ SMA) (Ramadori *et al.*, 1990) wider. Gleichzeitig wird GFAP vermindert und das Intermediärfilament Nestin verstärkt exprimiert (Niki *et al.*, 1996; Niki *et al.*, 1999). Weitere Merkmale der Aktivierung sind eine einsetzende Proliferation und Migration (Friedman, 2008), die Produktion von EZM, vor allem Kollagen I (Friedman *et al.*, 1985; Geerts *et al.*, 1989; Maher & McGuire, 1990), der Verlust der Vitamin A-haltigen Lipidtröpfchen und die Sekretion verschiedener parakrin und autokrin wirkender Zytokine (Friedman, 2008).



**Abbildung 1: Mechanismen der HSZ-Aktivierung.** Die Abbildung ist eine Übersicht über die Mechanismen der HSZ-Aktivierung. Diverse Leberschädigungen führen zu einer veränderten Morphologie und einem veränderten Verhalten der HSZ. Wichtige Charakteristika einer aktivierten HSZ sind: Verstärkte Sekretion, Migration, Produktion extrazellulärer Matrix und Proliferation, sowie eine veränderte Genexpression. ( $\alpha$ SMA: *alpha-smooth muscle-actin*, EZM: extrazelluläre Matrix, GFAP: *glial fibrillary acidic protein*, HSZ: Hepatische Sternzelle)

Die Aktivierung der HSZ erfolgt vermutlich durch eine parakrine Stimulation durch benachbarte Zellen. Ein sehr starker profibrotischer Faktor ist beispielsweise das Cytokin TGF $\beta$  (Matsuoka *et al.*, 1989), aber auch Bestandteile der EZM wie Fibronectin aus Endothelzellen (Jarnagin *et al.*, 1994) oder reaktive Sauerstoffspezies (Nieto *et al.*, 2002) können die Aktivierung der HSZ auslösen. Abbildung 1 fasst die Mechanismen der HSZ-Aktivierung zusammen.

Vor allem aufgrund der verstärkten EZM-Produktion werden HSZ häufig als der Zelltyp dargestellt, der für Ausbildung und Progression der Leberfibrose verantwortlich ist (Maher & McGuire, 1990). Neuere

Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass HSZ neben ihrer Funktion in der Wundheilung und der Fibrose auch Charakteristika mesenchymaler Stammzellen aufweisen.

Mesenchymale Stammzellen (MSZ) sind adulte Stammzellen, die in vielen verschiedenen Geweben, beispielsweise Knochenmark oder Fettgewebe vorkommen (Zomer *et al.*, 2015). Stammzellen haben die Fähigkeit sich zu replizieren und dabei ihren Stammzellcharakter aufrechtzuerhalten, dies wird auch als Selbsterhaltung bezeichnet. Außerdem besitzen sie die Plastizität in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Zomer *et al.*, 2015). Damit können sie einen wichtigen Beitrag zur Regeneration leisten und das wissenschaftliche Interesse an MSZ ist entsprechend groß. MSZ aus verschiedenen Organen bilden eine sehr heterogene Gruppe. Die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (ISCT) hat daher 2006 Eigenschaften definiert, die MSZ aufweisen müssen (Dominici *et al.*, 2006). Dazu zählt erstens die Adhärenz der Zellen auf einer Plastikoberfläche. Des Weiteren müssen die Zellen die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 exprimieren, dürfen aber keine Expression von Oberflächenmarkern wie CD45 oder CD34 aufweisen. Drittens müssen die Zellen *in vitro* zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenziert werden können. Uneinigkeit herrscht noch über das Differenzierungspotential der MSZ. Während einige Stimmen behaupten, dass es sich bei diesem Zelltyp um eine multipotente, gewebsspezifische Stammzelle handelt, die sich *in vivo* nur in Zellen mesodermalen Ursprungs entwickeln kann (Robey, 2017; Zomer *et al.*, 2015), zeigen andere Forschergruppen die Differenzierung von Knochenmarks-MSZ in Endothelzellen (Oswald *et al.*, 2000) und Epithelzellen (Spees *et al.*, 2003). Kritiker dieser Arbeiten bemängeln fehlende allgemeingültige Kriterien für die Differenzierung, nicht standardisierte Kulturbedingungen und erklären die beschriebenen Beobachtungen mit Zellfusionen (Krampera *et al.*, 2007).

Das Expressionsmuster von MSZ aus dem Knochenmark und HSZ ist sehr ähnlich, so exprimieren primäre HSZ aus der Ratte und die immortalisierte humane HSZ-Zelllinie LX-2 wie MSZ auch CD133 (Kordes *et al.*, 2007), CD44, CD73, CD105, CD271 und Nestin (Kordes *et al.*, 2007; Kordes *et al.*, 2013; Castilho-Fernandes *et al.*, 2011; Sawitza *et al.*, 2015; Niki *et al.*, 1999). Des Weiteren zeigen HSZ auch funktionelle Ähnlichkeiten zu MSZ und entwickeln sich *in vitro* unter der Behandlung mit entsprechenden Differenzierungsmedien zu Osteozyten, Adipozyten (Castilho-Fernandes *et al.*, 2011; Kordes *et al.*, 2013) oder Hepatozyten-ähnlichen Zellen (Kordes *et al.*, 2014.). Hepatische Sternzellen können des Weiteren die Erhaltung und Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen unterstützen (Kordes *et al.*, 2013), eine zentrale Funktion der MSZ des Knochenmarks. In einem stammzellbasierten Leberregenerationsmodell konnten transplantierte HSZ sowohl in die Leber des Wirtes migrieren und dort epitheliale Progenitorzellen, Hepatozyten und Cholangiozyten bilden, als auch in das Knochenmark migrieren und nach Retransplantation wieder erfolgreich zur Leberregeneration beitragen (Kordes *et al.*, 2014).

HSZ erhalten ihren Stammzellcharakter im Disseschen Raum aufrecht, der ihnen als Stammzellnische dient. Die Stammzellnische ist definiert als das Mikromilieu von Stammzellen, in dem parakrine sowie direkte physische Interaktionen zwischen Stammzellen und benachbarten Zellen stattfinden. Dieser besondere Bereich schützt und erhält die Stammzellen in ihrem undifferenzierten und selbstreplizierenden Zustand (Fuchs *et al.*, 2004). Auch im Disseschen Raum konnten solche Interaktionen nachgewiesen werden. So exprimieren die SEZ *stromal-cell derived factor 1* (Sdf1) und die HSZ den C-X-C Chemokinrezeptor Typ 4 CXCR4 (Sawitza *et al.*, 2009). Der Ligand Sdf1 und sein Rezeptor CXCR4 sind im hämatopoetischen System dafür bekannt, die Lokalisation der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zu vermitteln (Dar *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2001). Hepatozyten exprimieren Liganden des  $\beta$ -catenin-abhängigen Wnt-Signalweges und Notch-Liganden, wie Wnt7a/b und Jagged1. Die HSZ exprimieren entsprechend Wnt- und Notch-Rezeptoren. In ruhenden HSZ ist der  $\beta$ -catenin abhängige Wnt-Signalweg aktiv (Kordes *et al.*, 2008), ein Signalweg, der in embryonalen Stammzellen für die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustandes erforderlich ist (Sato *et al.*, 2004). Die Interaktion zwischen Jagged1 und dem Notch1-Rezeptor konnte zudem als essentiell für die Erhaltung von neuronalen Stammzellen nachgewiesen werden (Nyfeler *et al.*, 2005). Des Weiteren trägt die Zusammensetzung der Basallamina im Disseschen Raum zum Erhalt des Stammzellcharakters bei, sie besteht hauptsächlich aus Laminin und Kollagen Typ IV, (Gaca *et al.*, 2003; Sawitza *et al.*, 2009). Bekannte Stammzellnischen, wie die der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zeigen außerdem eine Innervierung durch das sympathische Nervensystem (Katayama *et al.*, 2006), die ebenfalls für HSZ im Disseschen Raum nachgewiesen werden konnte (Kordes & Häussinger 2013).

## 1.4 Epigenetik

Alle Zellen eines Organismus besitzen das gleiche Genom. Eine entwicklungs- und zelltypspezifische Genexpression wird erst durch weitere Regulationsmechanismen realisiert. Eine wichtige Rolle spielen dabei epigenetische Mechanismen. Der Begriff Epigenetik umfasst alle erblichen Veränderungen der Genexpression, die ohne Veränderungen der DNA-Sequenz einhergehen (Chuang & Jones, 2007). Zu den epigenetischen Mechanismen zählen unter anderem DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen, zwei Mechanismen, die einen Einfluss auf die Chromatinstruktur haben und dadurch die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie regulieren können. Histonmodifikation umfassen eine ganze Reihe verschiedener Modifikationen, die an unterschiedlichen Positionen auftreten können und damit ganz unterschiedliche Konsequenzen für die Genexpression haben. DNA-Methylierungen finden hingegen vor allem an der Base Cytosin statt, wenn diese von einem Guanin gefolgt wird, dies wird auch als CpG-Dinukleotid bezeichnet.

### 1.4.1 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe auf das Kohlenstoffatom C5 im Basenring eines Cytosins übertragen. CpG-Dinukleotide sind im Genom unterrepräsentiert, da methylierte Cytosine spontan zu Thymin deaminieren können und somit eine mutagene Gefahr für das Genom darstellen (Duncan & Miller, 1980). Ein methyliertes Cytosin im CpG-Kontext tritt gleichzeitig immer auch in dem komplementären DNA-Strang auf, da das CpG-Dinukleotid eine kurze palindromische Sequenz darstellt. Ein gehäuftes Vorkommen an CpG-Dinukleotiden wird als CpG-Insel bezeichnet. Diese sind durchschnittlich 1000 Basenpaare (bp) lang und haben ein zehnfach erhöhtes Auftreten von CpG-Dinukleotiden im Vergleich zum gesamten Genom (Bird *et al.*, 1985). Abgesehen von der höheren Dichte an CpG-Dinukleotiden im Vergleich zum Rest des Genoms zeigen die CpG-Inseln allerdings keine auffälligen Sequenzähnlichkeiten (Cross *et al.*, 1994). Die Hälfte aller CpG-Inseln befinden sich im Bereich von Transkriptionsstartstellen (TSS) (Illingworth *et al.*, 2010), so weisen 72% der Promotoren im humanen Genom im Vergleich zum Rest des Genoms einen erhöhten CpG-Gehalt auf. Die andere Hälfte der CpG-Inseln sind nicht mit Promotoren assoziiert, sie sind gleichmäßig über das Genom verteilt und sowohl in Genkörpern, als auch außerhalb von Genen lokalisiert (Illingworth *et al.*, 2010). CpG-Inseln, die mit TSS assoziiert sind, liegen häufig unmethyliert vor (Saxonov *et al.*, 2006), wohingegen CpG-Inseln außerhalb von Promotoren häufiger methyliert vorliegen. Dabei sind CpG-Inseln innerhalb von Genen eher methyliert, als solche die außerhalb von Genen liegen (Illingworth *et al.*, 2010). Ein weiteres Merkmal von CpG-Inseln ist das Auftreten der Histonmodifikation H3K4me3, diese dreifache Methylierung an Lysin 4 des Histon H3 ist ein Marker für Chromatin, dass aktiv transkribiert wird (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Während die H3K4-Methylierung mit aktiver Transkription und fehlender DNA-Methylierung assoziiert ist, ist die H3K9-Methylierung typisch für methylierte DNA-Bereiche (Mikkelsen *et al.*, 2008). Es gibt viele Hinweise auf eine kooperative Regulation der Genaktivität durch Histonmodifikationen und DNA-Methylierung. Ein Netzwerk aus zahlreichen Enzymen sorgt für diese Regulation (Cheng & Blumenthal, 2010), so ist beispielsweise das Vorhandensein von H3K4-Demethylasen notwendig, damit eine DNA-Methylierung erfolgen kann (Wang *et al.*, 2009).

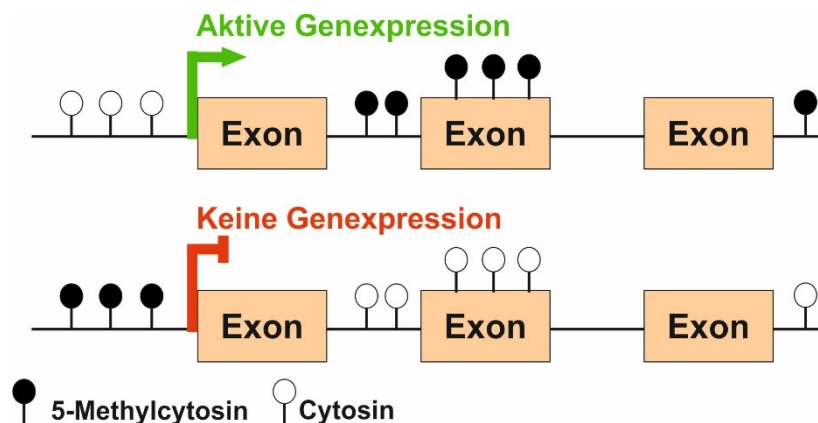
### 1.4.2 DNA-Methylierung und Genexpression

Die Lage vieler CpG-Inseln im Bereich der TSS gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die DNA-Methylierung in Zusammenhang mit der Genexpression steht. Zunächst konnte gezeigt werden, dass DNA-Methylierungen im Promoterbereich zu einer verminderten Genexpression des assoziierten Gens führen (Stein *et al.*, 1982) (Abbildung 2). Auch die Behandlung von Zellen mit 5-Azacytidin (5-azaC) zeigt, dass die Promotermethylierung negativ mit der Genexpression korreliert (Hansen & Gartler, 1990; Mohandas *et al.*, 1981). Bei der Replikation wird das Cytidinanalogue 5-azaC anstelle von Cytidin

in den Tochterstrang eingebaut, dadurch kommt es zu einer kovalenten Bindung und Inaktivierung der DNA-Methyltransferasen und infolgedessen zu einer passiven Demethylierung der DNA (Juttermann *et al.*, 1994).

DNA-Methylierungen spielen auch bei Krebserkrankungen eine wichtige Rolle, so konnte gezeigt werden, dass der genomische Gehalt an 5-Methylcytosin (5mC) in Tumorgewebe geringer ist als im entsprechenden gesunden Gewebe (Gama-Sosa *et al.*, 1983). Außerdem ist die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch die Hypermethylierung ihrer Promotoren ein wichtiges Merkmal vieler Tumore (Herman, 1999).

Im Gegensatz zur Promotermethylierung führt die DNA-Methylierung im Genkörper zu einer verstärkten Transkription des betroffenen Gens (Murrell *et al.*, 2001). Diese gegensätzlichen Verhältnisse werden auch als DNA-Methylierungs-Paradoxon bezeichnet (Jones, 1999) (Abbildung 2) und weisen darauf hin, dass die Transkriptionsinitiation, aber nicht die Transkriptionselongation durch DNA-Methylierung verhindert werden kann.



**Abbildung 2: Regulation der Genexpression durch DNA-Methylierung.** Je nach Lokalisation in Relation zum Gen hat die DNA-Methylierung einen anderen Einfluss auf die Genexpression. Methyliertes Cytosin im Genkörper ist mit einer aktiven Genexpression assoziiert, wohingegen ein Vorkommen von 5-Methylcytosin im Promoterbereich zu einer Inhibition der Genexpression führt.

### 1.4.3 Weitere Funktionen der DNA-Methylierung

Die Funktion der DNA-Methylierung ist allerdings nicht nur auf die Regulation der Expression einzelner Gene beschränkt. Eine weitere Aufgabe der DNA-Methylierung ist es, die Transkription transposabler Elemente (TE) zu verhindern (Yoder *et al.*, 1997). Dabei handelt es sich um Abschnitte des Genoms, die sich selbst replizieren und an zufällige Stellen im Genom inserieren können. Durch die zufällige Integration im Genom ergibt sich eine erhöhte mutagene Gefahr und die Notwendigkeit eines Mechanismus, der diese Transposition reguliert und die Stabilität des Genoms bewahrt. Die DNA-Methylierung der hochrepetitiven Satelliten-DNA im Zentromerbereich ist beispielsweise sehr wichtig

für die Erhaltung der Chromosomenstabilität. Das autosomal-rezessiv vererbte Immundefizienz, Zentromerinstabilität und Gesichtsdysmorphismus-Syndrom (ICF, Online Mendelian Inheritance in Man #242860) ist unter anderem gekennzeichnet durch Zentromerinstabilität und DNA-Hypomethylierung. Häufig liegt der Erkrankung eine Mutation der DNA-Methyltransferase (Dnmt)3b-Methyltransferase zugrunde, die spezifisch für die Methylierung der Satelliten-DNA zuständig ist (Moarefi & Chedin, 2011; Okano *et al.*, 1999).

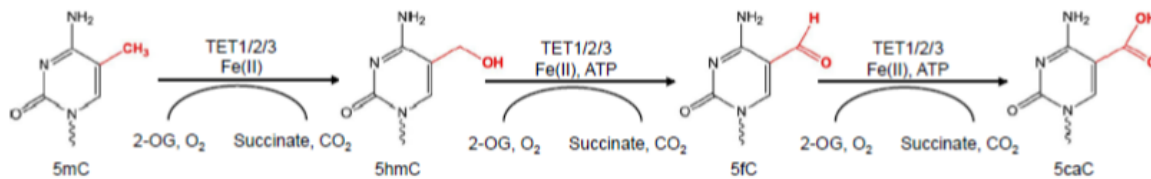
Die Methylierung der DNA ist außerdem verantwortlich für die X-Chromosom-Inaktivierung zur Dosiskompensation in weiblichen Säugetieren (Mohandas *et al.*, 1981; Wolf *et al.*, 1984) und für das *Imprinting*, im Deutschen auch genomische Prägung genannt. Einige Gene des Genoms werden, obwohl sie im diploiden Chromosomensatz als paternal und maternal vererbtes Allel vorliegen, nur von einem der Allele transkribiert. Das zweite Allel wird durch DNA-Methylierung transkriptionell inaktiviert (Swain *et al.*, 1987). Dass es sich dabei um einen sehr wichtigen Mechanismus handelt, zeigt sich z.B. daran, dass ein Verlust der genomischen Prägung im Gen für *Insulin-like growth factor II* (Igf2), welches normalerweise nur vom paternalen Allel exprimiert wird (Ferguson-Smith *et al.*, 1991), zur Entstehung des adulten Wilms Tumor, einem Nephroblastom, beiträgt (Oda *et al.*, 1997). Auch die Aktivität von Enhancern kann durch DNA-Methylierung kontrolliert werden. So scheint die Methylierung von Enhancern ein wichtiger Faktor zur Regulation der Genexpression zu sein und negativ mit der Transkription zu korrelieren (Aran *et al.*, 2013). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Enhancer-Methylierung und gleichzeitig auch die Expression der assoziierten Gene in Krebszellen verändert ist (Aran *et al.*, 2013). Eine weitere Studie zeigt, dass in der Wirbeltierentwicklung eine spezifische DNA-Demethylierung von Enhancern auftritt, die für die Regulation von Entwicklungsgenen verantwortlich sind (Bogdanović *et al.*, 2016). Über diese Funktionen hinaus spielt die DNA-Methylierung auch in der Regulation des Spleißvorgangs eine Rolle, denn Transkriptionsfaktoren, die auch an der Regulation alternativer Exons beteiligt sind, binden gewebespezifisch und DNA-methylierungsabhängig an alternativ gespleißten Exons (Wan *et al.*, 2013). Exons weisen eine höhere DNA-Methylierung auf als Introns. Dadurch ist eine Diskriminierung dieser unterschiedlichen genomischen Bereiche und über die Rekrutierung unterschiedlicher Faktoren ein Ein- oder Ausschluss alternativer Exons in die messenger RNA (mRNA) möglich.

#### 1.4.4 DNA-Methylierungs- und –Demethylierungsprozesse

Die zellulären Prozesse, die den Auf- und Abbau der DNA-Methylierungen vermitteln, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und auch aktuell Gegenstand vieler Forschungsstudien. Bei der DNA-Methylierung unterscheidet man die Erhaltungsmethylierung und die *de-novo*-Methylierung. In Säugern sind vier verschiedene Dnmt bekannt, die unterschiedliche Funktionen übernehmen. Die Dnmt1 ist für die Erhaltungsmethylierung zuständig, denn die katalytische Domäne des Enzyms hat

eine erhöhte Affinität für hemimethylierte DNA (Fatemi *et al.*, 2001; Goyal *et al.*, 2006) wie sie bei der semikonservativen Replikation entsteht. Dnmt1 ist während der Synthesephase an der Replikationsgabel lokalisiert (Leonhardt *et al.*, 1992), dort benutzt das Enzym den bereits methylierten Mutterstrang als Matrize, um den Tochterstrang entsprechend zu methylieren. Die Dnmt3a und 3b sind *de-novo*-Methyltransferasen, sie produzieren neue DNA-Methylierungen in zuvor unmethylierten Bereichen, und spielen vor allem in der Embryonalentwicklung eine essentielle Rolle (Okano *et al.*, 1999). Die Dnmt3l ist katalytisch inaktiv (Hata *et al.*, 2002), kann aber die katalytische Aktivität von Dnmt3a und 3b erhöhen (Suetake *et al.*, 2004). Alle Dnmt besitzen eine DNA-Bindedomäne zur sequenzspezifischen Bindung der DNA und eine katalytische Domäne, die auch eine Bindedomäne für den reaktiven Methylgruppenüberträger S-Adenosyl-Methionin (SAM) besitzt. Bei DNA-Bindung wird das zu methylierende Cytosin aus der DNA-Doppelhelix herausgedreht, sodass eine kovalente Bindung zwischen dem Cytosin und einem Cystein in der katalytischen Domäne der Dnmt entsteht. Diese ermöglicht einen elektrophilen Angriff des C5-Atoms des Cytosins auf die Methylgruppe des SAM und die Übertragung der Methylgruppe auf das Cytosin (Cheng, 1995; Klimasauskas *et al.*, 1994; Wu & Santi, 1985).

Im Gegensatz zu den DNA-Methyltransferasen, welche die direkte Methylierung der DNA übernehmen, ist im Tierreich bisher keine direkte DNA-Demethylase bekannt, welche die entgegengesetzte Reaktion katalysiert. Generell werden zwei Mechanismen der DNA-Demethylierung beschrieben. Zum einen kann die DNA passiv demethyliert werden. Dieser Mechanismus ist replikationsabhängig (Matsuo *et al.*, 1998) und beruht auf einer Inhibition der Dnmt1 (Wu & Zhang, 2010). Wenn bei der semikonservativen Replikation die Erhaltungsmethyltransferase den noch unmethylierten Tochterstrang nicht modifiziert, geht diese Information für die nächste Replikation verloren und über mehrere aufeinanderfolgende Replikationszyklen kommt es dann zu einer schrittweisen Demethylierung der DNA. Von der passiven DNA-Demethylierung wird die replikationsunabhängige aktive DNA-Demethylierung unterschieden. Die aktive DNA-Demethylierung besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden enzymatisch katalysierten Reaktionsschritten. Es werden verschiedene mögliche Reaktionswege zur Eliminierung von 5mC diskutiert, die aber alle auf dem gleichen Prinzip beruhen. Eine zentrale Rolle spielen in diesem Zusammenhang die Ten-eleven-Translocation (Tet)-Proteine 1-3. Diese Dioxygenasen können methyliertes Cytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) (Ito *et al.*, 2010) und weiter zu 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC) oxidieren (Ito *et al.*, 2011) (Abbildung 3). Die Funktionen dieser drei Cytosinmodifikationen sind noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings zeigt sich, dass sie auch als Zwischenstufen während der aktiven DNA-Demethylierung auftreten (Weber *et al.*, 2016).



**Abbildung 3: Mechanismus der TET-Katalyse.** Die Dioxygenasen Tet 1,2 und 3 oxidieren methyliertes Cytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) und weiter zu 5-Formylcytosin (5fC) und 5-Carboxylcytosin (5caC). Diese Abbildung entstammt Tan & Shi 2012.

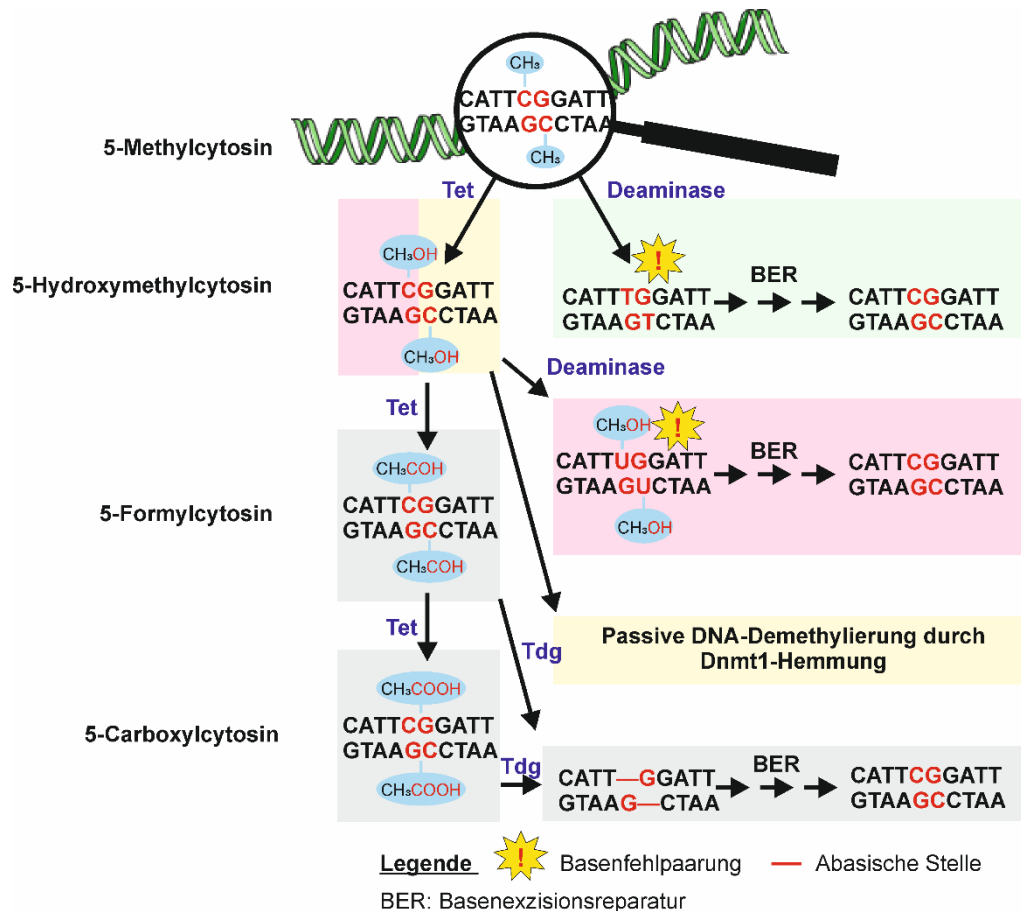
5fC und 5caC werden durch die G/T-Fehlpaarungs-spezifische Thymin-DNA-Glykosylase Tdg erkannt (He *et al.*, 2011; Maiti & Drohat, 2011), welche die Base über die Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Pentose entfernt und so eine abasische Stelle in der DNA entstehen lässt. Die wichtige Rolle für Tet-Proteine und Tdg während der aktiven DNA-Demethylierung wurde durch *Knockout* (KO)-Studien belegt. Ein Tdg-KO führt zu embryonaler Letalität sowie zur Hypermethylierung gewebsspezifischer Promotoren und Enhancern während der Entwicklung (Cortellino *et al.*, 2011). Die durch Tdg entstandene abasische Stelle wird von Endonukleasen erkannt und aus der DNA-Doppelhelix entfernt, sodass ein Strangbruch auftritt, der über die DNA-Reparaturmaschinerie der Zelle wieder aufgefüllt und ligiert wird (Weber *et al.*, 2016). Die DNA-Reparatur, bei der nur eine Base aus der DNA geschnitten und ersetzt wird, wird auch als Basen-Exzisions-Reparatur bezeichnet. Über einen alternativen Weg wird 5hmC durch spezifische Deaminasen deaminiert, dadurch entsteht 5-Hydroxymethyluracil. Uracil paart im Gegensatz zu Cytosin nicht mit Guanin, sondern mit Adenin, sodass es an dieser Stelle zur Ausbildung einer Fehlpaarung kommt, die wiederum von DNA-Glykosylasen erkannt und entfernt werden kann (Cortellino *et al.*, 2011).

Die weitere Reparatur erfolgt, wie oben beschrieben, über die DNA-Reparaturmaschinerie. Gleichwohl kann auch 5mC zu Thymin deaminiert und die sich ergebende Fehlpaarung durch DNA-Glykosylasen erkannt werden (Cortellino *et al.*, 2011; Wiebauer & Jiricny, 1990). Am Ende aller Reaktionswege wird das ursprünglich methylierte Cytosin durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt.

Viele Studien weisen auf eine Rolle der BER in der aktiven DNA-Demethylierung hin, allerdings ist dies auch ein potentiell mutagener Mechanismus, da es zur Ausbildung von DNA-Strangbrüchen kommt. Eine weitere Möglichkeit der DNA-Demethylierung wäre die Katalyse von 5caC direkt zu Cytosin durch eine Decarboxylase. Ein Enzym, das diese Aufgabe übernimmt, konnte allerdings bisher nicht identifiziert werden (Drohat & Coey, 2016). Das über Oxidation entstandene 5hmC kann zudem auch verhindern, dass Dnmt1 die Erhaltungsmethylierung nach Replikation durchführt, so dass denkbar wäre, dass nach der Oxidation von 5mC eine passive DNA-Demethylierung erfolgt (Valinluck & Sowers, 2007). Die in diesem Abschnitt vorgestellten möglichen Reaktionswege zur aktiven DNA-Demethylierung sind in Abbildung 4 zusammengefasst.



Als weitere mögliche Mechanismen zur aktiven DNA-Demethylierung werden Nukleotid-Exzisions-Reparatur und eine enzymatische Entfernung der Methylgruppe unter Entstehung von Formaldehyd diskutiert (Zhang *et al.*, 2011).



**Abbildung 4: Mögliche Mechanismen der aktiven DNA-Demethylierung.** 5-Methylcytosin kann auf unterschiedlichen Reaktionswegen demethyliert werden. Tet-Enzyme können 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin und weiter zu 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin oxidieren. 5-Hydroxymethylcytosin kann zum einen zu 5-Hydroxymethyluracil deaminiert werden, die so entstandene Basenfehlpaarung wird durch die Basenexzisionsreparatur erkannt und repariert. Zum anderen führt die Inhibition von Dnmt1 durch 5-Hydroxymethylcytosin zu einer passiven DNA-Demethylierung. 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin werden durch die Glykosylase Tdg erkannt, welche die Base entfernt. Die entstandene abasische Stelle wird durch die Basenexzisionsreparatur erkannt und korrigiert. 5-Methylcytosin kann auch direkt durch eine Deaminase zu Thymin deaminiert werden, sodass erneut eine Basenfehlpaarung entsteht, die im Anschluss repariert wird. (Dnmt: DNA-Methyltransferase)

## 1.5 Dynamik der DNA-Methylierung während der Entwicklung

Trotz der etablierten Definition, dass epigenetische Modifikationen stabil und vererbbar sind, kann im Rahmen von Entwicklungsprozessen eine bemerkenswerte Dynamik der DNA-Methylierung beobachtet werden. Veränderungen der DNA-Methylierung finden in der Embryonalentwicklung, während der Differenzierung von adulten Stammzellen, sowie während der Tumorentstehung und natürlichen Alterungsprozessen statt (Suelves *et al.*, 2016). In der Embryonalentwicklung kommt es

sowohl in den primordialen Keimzellen (Hajkova *et al.*, 2002) als auch vor der Implantation des Embryos in den beiden Vorkernen (Santos *et al.*, 2002) zu einer starken globalen DNA-Demethylierung. Da in diesen Prozessen die epigenetische Information beinahe vollständig entfernt wird und danach zelltypspezifisch neu etabliert wird, spricht man von einer epigenetischen Reprogrammierung (Simonsson & Gurdon, 2005). Dieser Begriff impliziert auch die Möglichkeit, dass das Differenzierungspotential der Zellen erst durch die starke DNA-Demethylierung freigeschaltet wird und dieser Prozess die weitere Entwicklung der Zellen ermöglicht.

Die globale DNA-Demethylierung der primordialen Keimzellen erfolgt aktiv unter Beteiligung des BER während ihrer Wanderung in die Genitalleiste, dabei weisen die primordialen Keimzellen eine verstärkte Expression von Tet1 auf (Hajkova *et al.*, 2002; Hajkova *et al.*, 2010). Gleichzeitig exprimieren die primordialen Keimzellen vermindert Dnmt3a und b (Kurimoto *et al.*, 2008), sodass die globale DNA-Demethylierung teilweise auch auf passive Prozesse zurück zu führen ist. Vor der Befruchtung weist die Spermien-DNA eine CpG-Methylierung von 80%, die DNA der Eizelle 40% auf (Popp *et al.*, 2010). Die DNA-Demethylierung erfolgt dann in den beiden Vorkernen asymmetrisch. Im männlichen Vorkern findet eine sehr schnelle aktive Demethylierung statt (Mayer *et al.*, 2000), bei der als Zwischenprodukt 5hmC auftritt (Gu *et al.*, 2011). Essentiell für diesen Prozess ist Tet3, das sowohl in der Oozyte als auch in der Zygote im Gegensatz zu Tet1 und Tet2 exprimiert wird (Gu *et al.*, 2011). Die langsamere DNA-Demethylierung im weiblichen Chromosomensatz findet während der ersten Zellteilungen statt, sodass hier von einem passiven Mechanismus ausgegangen wird (Rougier *et al.*, 1998). Es gibt allerdings auch Hinweise auf aktive DNA-Demethylierungsprozesse (Guo *et al.*, 2014). Ebenso konnte auch im männlichen Chromosomensatz in Abhängigkeit vom Genlokus sowohl passive als auch aktive DNA-Demethylierung nachgewiesen werden (Guo *et al.*, 2014).

## 1.6 Epigenetische Veränderungen während der HSZ-Aktivierung

Auch in HSZ treten im Rahmen der Aktivierungsphase dynamische Veränderungen der DNA-Methylierung auf. Wenn die DNA-Demethylierung durch eine *in vitro*-Behandlung der HSZ mit 5-azaC induziert wird, kann der Aktivierungsprozess blockiert werden, dies konnte anhand morphologischer Betrachtung und der Expression von Markergenen gezeigt werden (Mann *et al.*, 2007). Außerdem konnte in aktivierenden HSZ eine geringere Menge des Methylgruppendonors SAM als in ruhenden Sternzellen nachgewiesen werden (Ramani *et al.*, 2010). Die epigenetische Regulation durch DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung wurde bisher lediglich für Einzelgene untersucht. Dabei werden zwei verschiedene Mechanismen der Regulation beschrieben, zum einen die Regulation in Abhängigkeit von dem Methyl-CpG-bindenden Protein 2 (MeCP2) und zum anderen von Dnmt1. Beide Enzyme werden während der HSZ-Aktivierung verstärkt exprimiert (Bian *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013). So wird die Expression des Ras-Inhibitors *RasGAP-activating like protein 1* (Rasal1) während der HSZ-

Aktivierung in Abhängigkeit von MeCP2 inhibiert. Dieser Prozess ist durch den Einsatz von 5-azaC reversibel, sodass von einer Regulation über Hypermethylierung im Bereich des Rasal1-Gens auszugehen ist (Tao *et al.*, 2011). Durch denselben Mechanismus wird auch die Expression von *protein patched homolog 1* (PTCH1) negativ reguliert, der PTCH1-Rezeptor ist als Komponente des Hedgehog-Signalwegs an der Regulation von Zellproliferation und –differenzierung beteiligt (Yang *et al.*, 2013). Des Weiteren wird der negative Regulator der HSZ-Aktivierung der *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual specificity protein phosphatase* PTEN über DNA-Methylierung reguliert. Während des Aktivierungsprozesses wird PTEN Dnmt1-abhängig im Promoter hypermethyliert, auch dieser Prozess ist durch die Behandlung mit 5-azaC umkehrbar (Bian *et al.*, 2012). Eine vergleichbare Promoter-Hypermethylierung und Reduktion der Expression konnte auch für einen Inhibitor des TGF $\beta$ -Signalwegs, *mothers against decapentaplegic homolog 7* (Smad7) gezeigt werden (Bian *et al.*, 2014). Der TGF $\beta$ -Signalweg spielt während der HSZ-Aktivierung eine wichtige Rolle. Des Weiteren sind auch die während der HSZ-Aktivierung differentiell exprimierten Gene CD133, *neurogenic locus notch homolog protein 1 und 3* (Notch1 und Notch3) über Promotermethylierung reguliert (Reister *et al.*, 2011). In einer weiteren Studie wurden die Promotermethylierungen in ruhenden und aktivierten humanen HSZ untersucht (El Taghdouini *et al.*, 2015). Dabei wurde eine starke Dynamik dieser Modifikation zwischen den beiden Zuständen sowie eine negative Korrelation zwischen Promotermethylierung und Genexpression beobachtet. Außerdem zeigen die Promotoren der betroffenen Gene auch entsprechende Histonmodifikationen, die aktive bzw. inaktive Promotoren markieren.

Neben der DNA-Methylierung sind auch Histonmodifikationen an der Regulation der HSZ-Aktivierung beteiligt. Während des Aktivierungsprozesses lässt sich eine Zunahme an aktivierenden Histonmodifikationen wie z.B. eine Dreifachmethylierung von Lysin 4 des Histon H3 (H3K4me3) beobachten (Perugorria *et al.*, 2012). Die Inhibition von Histondeacetylasen durch z.B. Trichostatin A verhindert eine Aktivierung der HSZ (Niki *et al.*, 1999). Ein verbindendes Glied zwischen der DNA-Methylierung und der Histonmodifikation scheint das Protein MeCP2 zu sein. MeCP2 bindet zum einen wie oben beschrieben an methylierte DNA und vermittelt dort zumeist die Repression der Transkription, zum anderen kann MeCP2 allerdings auch die Modifizierung von Histonen bedingen. In einem Leberfibrose-Modell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass MeCP2 während der HSZ-Aktivierung an den Promoter des *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ )-Gens bindet und dort die Methylierung von H3K9 vermittelt, dies führt zur Ausbildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin und zu einer verminderten Expression von PPAR $\gamma$ , einem Rezeptor der die HSZ-Aktivierung unterdrückt (Mann *et al.*, 2010). MeCP2 konnte außerdem als positiver Regulator der Histonmethyltransferase *Achaete-scute homolog 1* (Ash1) identifiziert werden. Ash1 wird während der

---

HSZ-Aktivierung verstärkt exprimiert und ist für das vermehrte Auftreten der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 verantwortlich (Perugorria *et al.*, 2012).

Nicht-kodierende RNAs komplettieren die epigenetischen Kontrollmechanismen der HSZ-Aktivierung. In einer globalen Analyse wurden die während der HSZ-Aktivierung differentiell exprimierten microRNAs (miRNA) untersucht. Während des Aktivierungsprozesses werden 47 miRNAs in ihrer Expression reduziert, während der Großteil der identifizierten kleinen RNA-Moleküle, 212 miRNAs verstärkt exprimiert werden (Coll *et al.*, 2015). Im ruhenden Zustand ist eine kleine Zahl an miRNAs, wie z.B. die miRNA 192 für die negative Regulation vieler Zielgene verantwortlich, diese Zielgene sind assoziiert mit Prozessen, die während der Aktivierung wichtig sind.

## 1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Dynamische epigenetische Modifikationen sind wichtige Faktoren zur Regulation der Genexpression. DNA-Methylierung und –Demethylierung sind als wichtige epigenetische Modifikation an der Steuerung vieler essenzieller Mechanismen wie Embryogenese, X-Inaktivierung, Imprinting aber auch Karzinogenese beteiligt. Obwohl HSZ mit ihrer charakteristischen Morphologie schon lange bekannt sind, ist die Funktion dieses Zelltyps weitestgehend ungeklärt. Die Identifikation der HSZ als mesenchymale Stammzelle der Leber liefert einen neuen Ansatz, die Aufgaben und Wichtigkeit der HSZ aufzuklären. In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, welche Rolle die DNA-Methylierung im Prozess der HSZ-Aktivierung spielt.

Da bereits bekannt ist, dass Veränderungen der DNA-Methylierung in der Regulation der HSZ-Aktivierung eine wichtige Rolle spielen, dies aber bisher nur an einzelnen Genen festgemacht bzw. nur die Promotermethylierung berücksichtigt wurde, erfolgte in dieser Arbeit eine Untersuchung der DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung in einem generellen Ansatz. Dafür wurde die Dynamik der DNA-Methylierung während dieses Prozesses auf globaler, genomweiter und genspezifischer Ebene untersucht. Da die DNA-Methylierung nachweislich einen Einfluss auf die Genexpression hat, wurden parallel dazu Veränderungen der Expression während der HSZ-Aktivierung bestimmt und analysiert. Signaltransduktionswege, die über diese Methoden als wichtig für den Aktivierungsprozess identifiziert wurden, wurden in Hinblick auf Interaktionspartner und Regulationsmechanismen untersucht. Des Weiteren wurde die Regulation der HSZ-Aktivierung durch DNA-Methylierung genauer charakterisiert und der Prozess der DNA-Demethylierung untersucht. Die Erforschung der epigenetischen Regulation sollte zum einen ein detaillierteres Bild des HSZ-Aktivierungsprozesses liefern. Zum zweiten können HSZ *in vitro* relativ leicht aktiviert werden und sind somit ein gutes Modell zur Erforschung adulter Stammzellen. Die so gewonnenen Erkenntnisse können, über den wichtigen Bereich der Leberfibrose hinaus, Ansätze für neue medizinische Interventionen liefern. Das Wissen

über Faktoren die für Aktivierung und Differenzierung benötigt werden und epigenetische Modifikationen, die während dieser kritischen Prozesse auftreten, könnten es ermöglichen, in diese Prozesse einzugreifen, um beispielsweise über eine zielgerichtete Differenzierung die Regeneration der Leber oder anderer Organe zu fördern.

## 2 Materialien

In Kapitel 2 werden alle Materialien aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden. Die Auflistung erfolgt in Tabellenform und ist in folgende Kategorien gegliedert: Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Komplettsysteme, Puffer, DNA- und RNA-Oligonukleotide, Primär- und Sekundärantikörper und Software.

**Tabelle 1: Liste aller verwendeter Geräte.**

Gerät	Hersteller
Analysewaage ABJ 1204NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Brutschrank Heracell 150i	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland VWR International, Radnor, USA
Elektronische Pipettierhilfe accujet pro	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
ELISA-Plattenreader	Dynatech, Rückersdorf, Deutschland
<b>Geldokumentationssysteme</b> Gelstick Touch ChemiDoc	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland BioRad Laboratories, München, Deutschland
Gelkammern SDS-Gele	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Mikroskop IX50	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Photometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Köttermann GmbH & Co.KG, Uetze, Deutschland
<b>Spannungsgeräte</b> Power Source 300V Power Pak 300	VWR International, Radnor, USA BioRad Laboratories, München, Deutschland
Mastercycler Personal	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TOptical Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Western Blot Transferkammern Hoefer TE77	GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom
Wide Mini-Sub Cell GT Elektrophoresekammer	BioRad Laboratories, München, Deutschland
<b>Zentrifugen</b> Eppendorf centrifuge 5415R Rotina 380R Plattenzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland StarLab International GmbH, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 2: Liste aller verwendeter Verbrauchsmaterialien.**

Produkt	Hersteller
Deckgläser	VWR International, Radnor, USA
Einweg-Plastikpipetten Stripetten	Corning Incorporated, Corning, USA
Glas-Pasteurpipetten	Brand GmbH + CoKG, Wertheim, Deutschland
Küvetten UVette routine pack	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Multi-well-Platten (12-well, 96-well)	Greiner BioOne International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Nitrozellulosemembran Amersham Protran 0,45 µm	GE Healthcare, Chalfont St Giles, United Kingdom
Papiertücher	Tapira GVS eG, Heidenheim, Deutschland
PCR-Platten FrameStar96	4titude limited, Wotton, United Kingdom
PCR-Platten Versiegelungsfolien	4titude limited, Wotton, United Kingdom
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl, +/- Filter)	StarLab International GmbH, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Sarstedt AG & CO, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm)	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellschaber	Corning Incorporated, Corning, USA
Zentrifugenröhrchen	Corning Incorporated, Corning, USA

**Tabelle 3: Liste aller verwendeter Chemikalien.**

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Appllichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Antibiotic-Antimycotic	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
β-Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DAPI Fluoromount-G	SouthernBiotech, Birmingham, USA
DMEM- high glucose (4500 mg/l Glukose)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Chemikalie	Hersteller
DNA-Ladepuffer (6x)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
EDTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Glyzin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ketavet (Ketaminhydrochlorid)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Kollagenase	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
L-Mimosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Milchpulver, fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumpyrophosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Vanadat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Nycodenz	Nycomed Pharma, Oslo, Norwegen
PBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
ProLong Gold antifade mountant with DAPI	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
Pronase Protease, <i>Streptomyces griseus</i>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Proteaseinhibitor	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland



Chemikalie	Hersteller
Proteinladepuffer Lane Marker Reducing Sample Buffer	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen Deutschland
Rotifree Stripping-Puffer 2.0	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese 10x TBE Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure rauchend 37%	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Western Blot HRP Substrat Advansta WesternBright ECL HRP Substrate Quantum, Sirius	Advansta Inc, Menlo Park, USA

Tabelle 4: Liste aller verwendeter kommerzieller Komplettsysteme und Restriktionsenzyme

System	Hersteller
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Epiect Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
HhaI (10U/μl)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
HpaII (10U/μl)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
Maxima Hot Start PCR Master Mix (2x)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x)	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
MethylFlash Methylated DNA 5mC Quantification Kit (colorimetric)	Epigentek Group Inc., Farmindale, USA
RevertAid First Strand cDNA synthesis Kit	Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Wizard SV Gel and PCR Clean up System	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland

System	Hersteller
ZR-Duet DNA/RNA Miniprep	Zymo Research Group, Irvine, USA

Tabelle 5: Liste aller verwendeter Puffer.

Puffer	Zusammensetzung
Elektrophoresepuffer	5 g/l SDS 15,1 g/l Tris 95 g/l Glyzin
PBST	PBS + 0,05 % Tween20
Protein-Lysepuffer	20 mM Tris pH 7,4 140 mM Natriumchlorid 10 mM Natriumfluorid 10 mM Natriumpyrophosphat 1% Triton X-100 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM Natrium-Vanadat 20 mM $\beta$ -Glycerolphosphat 20 Tabletten/l Proteaseinhibitor
Sammelgel	je 5 ml: 800 $\mu$ l Acrylamid (30%) 630 $\mu$ l Sammelgelpuffer 3,4 ml H <sub>2</sub> O 50 $\mu$ l SDS (10%) 10 $\mu$ l TEMED 100 $\mu$ l APS (10%)
Sammelgelpuffer	1 M Tris/HCl pH 6,8
TBS-T	20 mM Tris pH 7,4 150 mM Natriumchlorid 0,1% Tween20
Transferpuffer	40 mM SDS 10 mM Glyzin 10 mM Tris 25% Methanol
Trenngel	je 10 ml: 4,17 ml Acrylamid (30%) 2,5 ml Trenngelpuffer 100 $\mu$ l SDS (10%) 10 $\mu$ l TEMED 200 $\mu$ l APS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8

Tabelle 6 Auflistung aller während der Arbeit verwendeter DNA-Oligonukleotide.

Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')	ID
<b>Primer für Bisulfidsequenzierungen</b>			
APC2	TTTGGGTGGTGGGTATAGAGATA	CTTCATTAAAAAATCCCCAAATCT	NC_005106.4 (12258468..12280459)
Bmp4	GGTTTTTATGAATAAATTTGATAAA TATA	CCAACACTATAAAAAATTTCCATCA	NC_005114.4 (20776060..20791013)
Cnr2	GGTTTGGAGTTTAATTTTATGAAGG	ACATAACACCAAAAACCACCAATA	NC_005104.4 (154242010..154268126)
Dtx4	GTGGGTGTATGGGTAAGTATATTT	TTTCTCTCCAAAAACCTAATCCTAC	NC_005100.4 (228729842..228759783)
Klf2	GGAATTGGTGGTAAAGTTATTTTTTT	ATCAACTTCAAAAACCCAAAAATC	NC_005115.4 (19223087..19225037)
Lhx6	GATTAGGAAGTTAGGTGTTAGGGAA	CCAATCAATCAACTTAATAAAATTTAA	NC_005102.4 (15409349..15433504)
Lyve1	TGGTTTGTTTTTTGAATGAAATTT	CAACACTACAACCTAATATTACTCCTC	NC_005100.4 (175663266..175676699)
miR126	GGGTGGAGGTTAGTATTATGTTGAG	AAAAAATTTCTATCCCACAAAAAC	NC_005102.4 (4042488..4042560)
Mmrn2	AAATTTGTTGGAAAGTTGAGGTTAG	CAACCACTCAATCAATTCCTATATC	NC_005115.4 (10727552..10749303)
Robo4	GGAGGTAAGGTTTTGGATTTTTTAT	CAACCTAATCTACCTCACCTAAAC	NC_005107.4 (39082693..39093344)
Sparcl1	GGTTTTTTAAGTTTGTGTTGAA	TAACTACCCTTTTACATCCCTC	NC_005107.4 (39082693..39093344)
Sulf2	GAGGGGATGGGTAAATTTTAGT	CCAAAACCAAAAACCTCCTATA	NC_005102.4 (162791349..162872984,
Wnt5a	AAGGAGAAGTTTATTTTTTGGATTGT	ATTCTCAATCTACACTTTCTCTAAACC	NC_005115.4 (4469451..4490271)

Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')	ID
Wt1	TGAAAAGTTGGTTGATTTTTAGTT	CAAAACCATCTACAATAACCC	NC_005102.4 (95133221..95180574)
<b>Primer für Expressionsanalysen</b>			
Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')	ID
APC2	GCCTGCTGGAAGAACTAGACC	CGTGTCTACGTGTGGCAGTTC	NM_001106769
$\beta$ -Aktin	GCCCTAGACTTCGABCAAGA	CAGTGAGGCCAGGATAGAGC	NM_031144.3
Bmp4	ATCTTTACCGGCTCCAGTCT	AAAGCAGAGCTCTCACTGGTC	NM_012827.2
CD26	GTGCCTCTCATTGAATACTCC	AGTTGAGCTGAGAGAGTCTGTA	NM_012789.1
Cnr2	GATCTCTACCTACCGCTCAT	TTCCAGAGGACATACCCATAG	NM_001164143.3
Dtx4	TGTGTGTCTCACTCGTCCAC	ACTTCTCTGGGGTTTACCT	NM_001047855.1
Fra1	CCGAAGAAAGGAATTGACAG	GTCTTCTCTGGGATTTTGACAG	NM_012953
Klf2	AGCCTATCTTGCCGTCCTTT	GTCCCATGGACAGGATGAAGT	NM_001007684.1
Lhx6	CCGTCTGCTGGCAAGAATATC	AGCAGCTATTCTGCTGCCTCA	NM_001107837.1
Lyve1	CACGGAAGTTTACACAGAACC	GCACCAAAGAAGAAGAGAGCC	NM_001106286.1
miR126	TGACAGCACATTATTACTTTTG	TGACCACGCATTATTACTCA	NR_031871.1
Mmrn2	TCCAGGTTCTCCAACCCTAAT	CTGTTTTGCAGGCAGCTACA	XM_003751550.4
Notch1	ACAGTGGGGTATGCAAGGAG	ATTGGTGTCTGGCAAGAGG	NM_001105721.1
Notch2	CACCTTGAAGCTGCAGACATC	GAGAGAAGCCAGCATCAGTGG	NM_024358.2
Notch3	CTACCTTGCTCTGCTGAAAA	AGCCTGTCCAAGTGATCTGTG	NM_020087.2
Notch4	ATCAACACCCCTGGCTCCTT	CACTTCACAGAGCCTCCCTTC	NM_001002827.1
Robo4	CCTATATGTGTATGGCCACCAA	TTTTACAGTTCTGGGTTTCAGC	NM_181375.1
Rps6	GGAAGCGCAAGTCTGTCCGA	AGGTCCCAACCGACGAGGCA	NM_017160.1
Sparcl1	CCTCAAATACGGAGAGGAGAC	GTCCCTTTTACACTGGAAGT	NM_012946.1
Sulf2	AAGAACCCTCGAGAAGTCAGG	TTGTCTTCTCCTGCAGACC	NM_001034927.1
Vegf-d	CAACCATACGGGTTGTAAGTG	GTTATCCCACAGCATGTCAAC	XM_006256863.3
Wnt5a	GCAGCACAGTGGACAACACT	GGCTCATGGCATTTACCACT	NM_022631.2
Wt1	CATTCCTTCAAACACGAGGAC	AGCTGGGAGGTCATCTGGTA	NM_031534.2
<b>Primer für qAMP</b>			
Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')	ID
Actb (1)	GTGATAAATGGCCTTGAGTG	TGAGTGAGACATGCAAAGAGG	NC_005111.4 (13715843..13718813)
Actb (2)	CCAACCTTACCTTGCCACT	CCCTAGGCGGAAAGTTAAGC	s.o.

Gen	Primer forward (5'-3')	Primer reverse (3'-5')	ID
Erv1	CCAACATTCCTTTACCCTCT	TGATGGAACAGGATAGGAGA	LTR3_Rn
Erv2	CCAGACCTCCTAGATAGTGAA	GCCCACCACCTTCCTCTAAT	LTR2_Rn
Erv3	CCATTGTTTCATACCAAGCTG	GGTCACAAGCCTTGCCTATTT	LTR9_RN
Ervb1	TCGCTGAGCCTTTTTAGCCT	CCGACCAATCAAGGGCATA	ERVb1_1-LTR_RN
Ervb2	CCGTGCCTACAGCAGAGATA	AGTCCAGGTGCACATCTTCTT	ERVb2_2-LTR_RN
ID	TGGCAGCAAGAGCTAACGTTC	CTTCGGAGCTGAGGACCGAA	ID_Rn1
LINE1 (1)	CACTCCTGACACACAGGCTTA	CGATGATGCCATGTAGTCTTG	L1_RN
LINE 1 (2)	CCACCCAATTAGACAAGATGG	TCTCAGTTCAGTGGTTTGCTG	s.o.
SRV	ATCCAGGAGCGTCACTTATG	ATAATCAACACCTGCCTCTGC	SRV_RN_I

Tabelle 7: Liste aller verwendeter Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Wirt	Anwendung	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>			
Dtx4 (pAB) (25222-1-AP)	Kaninchen	WB: 1:1000 in 5% BSA	Proteintech, Rosemont, USA
Gadd45α (mAB) (sc-797)	Kaninchen	WB: 1:1000 in 5% BSA	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
MBD3 (mAB) (ab115692)	Maus	WB: 1:1000 in 5% Milch	Abcam, Cambridge, United Kingdom
Notch1 (C-20) (pAB) (sc-6014-R)	Kaninchen	WB: 1:1000 in 5% Milch	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Notch3 (pAB) (55114-1-AP)	Kaninchen	WB: 1:1000 in 5% Milch	Proteintech, Rosemont, USA
Phospho-Histone H2A.X (Ser139) 20E3 (mAB) (9718)	Kaninchen	WB: 1:1000 in 5% BSA	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Ref1 (C-4) (mAB) (sc-17774)	Maus	WB: 1:2500 in 5% Milch	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA

Antikörper	Wirt	Anwendung	Hersteller
Tdg (mAB) (sc-376652)	Maus	WB: 1:1000 in 5% BSA	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
Tet3 (mAB) (AC-M1092-3)	Maus	WB: 1:4000 in 5% Milch	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Wt1 (mAB) (05-753)	Maus	WB: 1:1000 in 5% Milch	Millipore, Temecula, USA
5-Methylcytidine 33D3 (mAB) (sc-56615)	Maus	IF: 1:100 verdünnt in PBST/1% BSA	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
<b>Sekundärantikörper</b>			
Antikörper	Wirt	Anwendung	Hersteller
Anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert (AP124C)	Ziege	IF: 1:500 verdünnt in PBST/1% BSA	Millipore, Temecula, USA
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert (AP192P)	Esel	WB: 1:10.000 verdünnt in 5% Milch oder 5% BSA	Millipore, Temecula, USA
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert (AP182P)	Esel	WB: 1:10.000 verdünnt in 5% Milch oder 5% BSA	Millipore, Temecula, USA

Tabelle 8: Liste aller verwendeter Softwareprogramme

Programm	Hersteller/ Referenz
AlphaView SA	Proteinsimple, San Jose, USA
BioEdit 7.2.5	Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
Cell <sup>^</sup> F	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland
Corel Draw Home and Student X8	Corel, München, Deutschland

---

<b>Programm</b>	<b>Hersteller/ Referenz</b>
EndNote X7	Thomson Reuters, New York, USA
Expression Console Software	Affymetrix, Santa Clara, USA
Chromas Lite 2.1.1	Technelysium, South Brisbane, Australia
Image Lab 5.2.1	BioRad Laboratories, München, Deutschland
Microsoft Office Access, Excel, PowerPoint, Word 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
qPCR Soft 3.1	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Transcriptome Analysis Console Software	Affymetrix, Santa Clara, USA

## 3 Methoden

### 3.1 Isolation und Kultur der Hepatischen Sternzellen

Die Isolation der HSZ aus der Rattenleber erfolgte im Wesentlichen nach der Methode von Hendriks und Mitarbeitern (Hendriks *et al.*, 1985). Verwendet wurden adulte Wistar-Ratten mit einem Gewicht von über 500 g. Nach Betäubung der Tiere mit Ketamin/Xylazin wurde die Leber zunächst mit physiologischer Salzlösung über die Pfortader perfundiert, dann entnommen und mit 0,35% Pronase sowie 0,028% Kollagenase durchspült, um einen Verdau der extrazellulären Matrix und eine Vereinzelung der Zellen zu erreichen. Über Zentrifugation bei geringer Zentrifugalkraft (50 x g) wurden im Anschluss die Parenchymzellen entfernt. Die Isolation der HSZ erfolgte über eine Nycodenz-Dichtezentrifugation (28% Nycodenz). Aufgrund ihres hohen Lipidgehalts reicherten sich die HSZ in einer Schicht im Dichtegradienten an. Die Isolationen der HSZ für die vorliegende Arbeit wurden von Claudia Rupprecht durchgeführt. Für die Gewinnung der primären HSZ aus Wistar-Ratten lagen Genehmigungen des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Recklinghausen, Deutschland unter folgenden Referenznummern vor: 84-02.04.2012A214 sowie 84-02.04-2012A344. Im Anschluss wurden die HSZ auf Zellkulturschalen ( $3 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm-Schale) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> sowie sättigender Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium enthielt zusätzlich 10% FCS, sowie 1% einer gebrauchsfertigen Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung (Arbeitskonzentrationen: 100 Units/ml Penicillin, 100 Units/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Fungizone® Antimycotic) und wird im Folgenden als DMEM<sup>++</sup> bezeichnet. Die HSZ adhärten innerhalb von vier Stunden nach Aussaat auf dem Plastikuntergrund. Nach dieser Zeit wurde ein erster Medienwechsel durchgeführt, um tote Zellen und nicht adhärte Fremdzellen zu entfernen. Weitere Medienwechsel erfolgten in einem Abstand von 2-3 Tagen. Die Reinheit der HSZ wurde am Mikroskop anhand der Morphologie sowie der Eigenfluoreszenz der Retinoide bei etwa 350 nm beurteilt.

Zur Diskriminierung zwischen einem passiven oder aktiven DNA-Demethylierungsmechanismus wurden die HSZ in Kultur mit L-Mimosin behandelt. Die nicht proteinogene Aminosäure L-Mimosin hemmt den Zellzyklus am Übergang der G1-Phase in die S-Phase (Watson *et al.*, 1991). Der Zellzyklusstopp wurde durch Zugabe von 1 mmol/l L-Mimosin in das Kulturmedium an den Tagen 0-4 der HSZ-Kultur eingeleitet und erhalten. Kontrollzellen erhielten eine äquivalente Menge an PBS, da das verwendete L-Mimosin in PBS gelöst war. Die Inhibition der DNA-Replikation wurde über einen Bromdesoxyuridin (BrdU)-Assay kontrolliert. Eine genaue Beschreibung dieser Methode erfolgt in Kapitel 3.6



## 3.2 Untersuchung der DNA-Methylierung

Zur Bestimmung der DNA-Methylierung in HSZ wurden die Zellen nach 4 Stunden (frisch isoliert, ruhend), einem Tag (ruhend), 3 Tagen (früh aktiviert) und 7 Tagen (aktiviert) nach mehrmaligem Waschen mit PBS lysiert und die DNA mithilfe des DNeasy® Blood and Tissue Kits aufgereinigt. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch.

### 3.2.1 Globale DNA-Methylierung

Die globale DNA-Methylierung gibt die Menge der in einer Probe vorhandener 5-Methylcytosine nach Markierung mit einem 5mC-spezifischen Antikörper an. Bei dieser Methode wird die Lage der DNA-Modifikation im Genom nicht berücksichtigt. Die Bestimmung der globalen DNA-Methylierung erfolgte mit dem Kit MethylFlash Methylated DNA 5mC Quantification Kit, das auf einem ELISA (*enzyme-linked immunosorbant assay*) beruht. Dabei wurden je Messung 100 ng DNA eingesetzt, jede Messung erfolgte im dreifachen technischen Replikat und in mindestens drei biologischen Replikaten. Das Experiment wurde nach der Gebrauchsanweisung des Herstellers durchgeführt. Prinzipiell wurde bei dieser Methode die DNA an einem Plastikuntergrund immobilisiert und methylierte Cytosine mit einem 5mC-spezifischen Antikörper markiert. Mittels eines zweiten HRP-markierten Antikörpers, der spezifisch für den zuvor gebundenen Primäantikörper war und einer Substratlösung wurde eine bei 450 nm messbare Farbentwicklung detektiert, die proportional zum Gehalt an methylierter DNA war. Die Absorptionen für frisch isolierte HSZ wurden als Referenz mit 100% DNA-Methylierung festgelegt und die übrigen Zeitpunkte in Relation zu dieser Referenz gesetzt.

### 3.2.2 Genomweite DNA-Methylierung

Im Gegensatz zur globalen DNA-Methylierung kann bei der Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung die Lokalisation der Modifikation im Genom durch Sequenzierung in basengenaue Auflösung bestimmt werden. Die Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung erfolgte als Auftragsarbeit durch ZymoResearch. Der Methyl-MiniSeq®-Service zur Detektion der genomweiten DNA-Methylierung beruhte auf einer Bisulfitbehandlung fragmentierter genomischer DNA-Proben. Bisulfit kann genutzt werden, um methylierte und unmethylierte Cytosine voneinander zu unterscheiden, da Bisulfit in einzelsträngiger DNA zur Deaminierung von Cytosin führt (Shapiro *et al.*, 1973; Shapiro, 1970), wohingegen die Deaminierung von 5mC eine zu vernachlässigende Reaktivität aufweist (Wang *et al.*, 1980). Dies führt dazu, dass durch die Bisulfitbehandlung methyliertes Cytosin als Cytosin erhalten bleibt, unmodifiziertes Cytosin allerdings zu einem Uracil deaminiert wird, sodass eine nachfolgende Replikation mittels PCR zu einem Wechsel von einer Cytosin:Guanin-Basenpaarung zu einer Adenin:Thymin-Basenpaarung führt. Mit den Bisulfit-behandelten DNA-Fragmenten wird dann im weiteren Verlauf eine Genombibliothek erstellt. *Über next generation sequencing* (NGS) wird

diese Bibliothek sequenziert und mit dem Rattengenom abgeglichen. Auf diese Weise können die vorliegenden methylierten Cytosine in ihren genomischen Regionen identifiziert werden. Diese Methode wird auch als *reduced representation bisulfite sequencing* (RRBS) (Meissner *et al.*, 2005) bezeichnet.

Zur Analyse der genomweiten DNA-Methylierung wurde die DNA aus frisch isolierten (ruhenden) und drei Tage kultivierten (frühe Aktivierung) HSZ gewonnen und zur Analyse eingeschickt. Die frisch isolierten Zellen wurden anhand ihrer Vitamin A-Fluoreszenz mittels *fluorescence assisted cell sorting* (FACS) sortiert, um die Reinheit der HSZ, vor allem ohne Kultur auf Plastik, zu gewährleisten. Diese FACS-Sortierung erfolgte als Auftragsarbeit durch die Core Flow Cytometry Facility des Institutes für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika am Universitätsklinikum Düsseldorf. Der Methyl-MiniSeq-Array wurde für eine einzelne HSZ-Präparation durchgeführt, die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Dabei wurden lediglich die Daten berücksichtigt, die differentiell methylierte Regionen (DMR) mit einer Veränderung von mindestens 20% zwischen den beiden Proben aufwiesen. Der gemessene Unterschied sollte zudem signifikant sein, das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die so erfolgte einfache Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung wurde im Anschluss für einzelne Gene über Bisulfit-Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in mindestens drei biologischen Replikaten verifiziert.

### 3.2.3 Genspezifische DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung einzelner Gene, die in der genomweiten DNA-Methylierungsanalyse eine differentielle Methylierung zwischen frisch isoliertem und früh aktiviertem Zustand aufwiesen, wurde mittels Bisulfit-Polymerasekettenreaktion (PCR) verifiziert. Zur Durchführung wurde DNA aus frisch isolierten sowie früh aktivierten HSZ mit Bisulfit behandelt, dazu wurde das Epitect® Bisulfite Kit verwendet. Zur Bisulfitbehandlung wurden jeweils 500 ng DNA eingesetzt und die bisulfitmodifizierte DNA in 40 µl Elutionspuffer eluiert. Das verwendete Temperaturprofil der Bisulfitbehandlung entsprach den Herstellerangaben (5 min 95°C, 25 min 60°C, 5 min 95°C, 85 min 60°C, 5 min 95°C, 175 min 60°C). Die Bisulfit-PCR wurde mit genspezifischen Primern durchgeführt, die nur bisulfitmodifizierte DNA amplifizierten. Die PCR erfolgte mit dem Maxima Hot Start PCR Master Mix. Die Hot Start Taq Polymerase wurde aufgrund ihrer Spezifität gewählt und sollte eine stabile Amplifikation der Adenin- und Thymin-reichen DNA gewährleisten. Für die im Anschluss an die PCR geplante Sequenzierung wurden PCR-Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 50 µl erstellt (Tabelle 9). Das PCR-Programm beinhaltete zunächst 10 Minuten bei 95°C zur Aktivierung der Hot Start Taq Polymerase und im Anschluss 45 Zyklen aus jeweils 20 Sekunden DNA-Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Primerbindung bei primerspezifischer Temperatur (APC2: 50°C, Bmp4: 53°C, Cnr2: 54°C,

Dtx4: 58°C, Klf2: 53°C, Lhx6: 53°C, Lyve1: 53°C, miR126: 53°C, Mmnr2: 54°C, Robo4: 54°C, Sparcl1: 58°C, Sulf2: 54°C, Wnt5a: 56°C, Wt1: 53°C) und 30 Sekunden Amplifikation bei 72°C.

**Tabelle 9 Zusammensetzung des PCR Master Mixes**

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
Maxima Hot Start PCR Master Mix (2x)	25
Vorwärtsprimer (10 $\mu$ M)	3
Rückwärtsprimer (10 $\mu$ M)	3
Bisulfitmodifizierte DNA	2,5
H <sub>2</sub> O	6,5

Jeweils 15  $\mu$ l der Amplifikate wurden in einem 2% Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht, um die spezifische Amplifikation des gewünschten Produkts zu überprüfen. Die restlichen 35  $\mu$ l der Amplifikate wurden mit dem Promega Wizard SV Gel and PCR Clean up Kit aus den PCR-Ansätzen aufgereinigt und im Anschluss sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte als Auftragsarbeit am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, dazu wurden die aufgereinigten PCR-Produkte zu einer Konzentration von 15 ng/ $\mu$ l verdünnt und gemeinsam mit den verwendeten Primern an das BMFZ versendet. Die Auswertung der Sequenzierungsdaten erfolgte in Anlehnung an die Mquant-Methode (Leakey *et al.*, 2008). Dazu wurden die Sequenzierungswerte für Thymin mittels BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) bestimmt. Für ein bestimmtes CpG wurde der Thymin-Sequenzierungswert des Cytosins von dem mittleren Sequenzierungswert von zehn originalen Thyminen aus der umgebenden Sequenz abgezogen. Dieser Wert wurde dann durch den mittleren Sequenzierungswert dividiert, um das relative Methylierungslevel des Cytosins im CpG zu erhalten.

### 3.2.4 Bestimmung der DNA-Methylierung in repetitiven Elementen

Zur Untersuchung des DNA-Methylierungsstatus in repetitiven DNA-Elementen wurde die Methode qAMP (quantitative Analyse der DNA-Methylierung mittels real-time PCR) angewendet (Oakes *et al.*, 2009). Da repetitive DNA-Elemente in großer Anzahl im Genom vorhanden sind und durch Konsensussequenzen gekennzeichnet sind, können sie mit dieser Methode gut im Ganzen untersucht werden. Die qAMP-Methode beruht auf dem Einsatz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen, welche die DNA an ihrer Erkennungssequenz nur dann schneiden, wenn diese nicht methyliert vorliegt. In einer anschließenden quantitativen PCR (qPCR) mit Primern, welche die Restriktionsschnittstelle flankieren, kann dann untersucht werden, ob die Restriktionsenzyme geschnitten haben (CpG ist unmethyliert) oder nicht (CpG ist methyliert). Die Beschreibung der Methode qPCR ist unter 3.3.3 zu finden. Zur Bestimmung der DNA-Methylierung in repetitiven Elementen wurde DNA aus null Tage alten (frisch isolierten) und drei Tage kultivierten (früh aktivierten)

HSZ verwendet. Die frisch isolierten HSZ wurden zur Erzielung einer höheren Reinheit mittels FACS sortiert. Die DNA wurde nach Aufreinigung mittels der Restriktionsenzyme HhaI oder HpaII verdaut. HhaI schneidet in der Sequenz GCGC, HpaII in der Sequenz CGGG und beide Enzyme schneiden nur, wenn die DNA unmethyliert vorliegt. Die Restriktion erfolgte mit 300 ng genomischer DNA und 1 µl des entsprechenden Restriktionsenzym im jeweils empfohlenen Restriktionspuffer für 1 Stunde bei 37°C. Die Primer für verschiedene repetitive Elemente wurden anhand der Konsensussequenzen aus der Datenbank RepBase ([www.girinst.org/repbase/](http://www.girinst.org/repbase/)) entworfen und so gewählt, dass die Amplifikate mindestens eine der oben genannten Restriktionsschnittstellen enthielten. In jedem qPCR-Ansatz wurden 2,5 ng verdaute DNA und 0,6 µM der entsprechenden Primer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in 1x Maxima SYBR Green pPCR Mastermix. Das PCR-Programm umfasste eine einmalige Aktivierung der Hot-Start-Taq-Polymerase bei 95°C für 10 Minuten. Im Anschluss folgten 40 Zyklen mit jeweils 20 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 20 Sekunden Primerannealing bei 56°C und 30 Sekunden Elongation bei 72°C. Die Spezifität des Produkts wurde über die Auswertung einer sich anschließenden Schmelzkurve bestimmt. Die Auswertung der PCR erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001), die in Absatz 3.3.3 genauer beschrieben ist. Dabei wurden die Ct-Werte für ein repetitives Element auf die Ct-Werte eines Gens, welches keine HhaI bzw. HpaII-Schnittstelle enthält (in diesem Fall Actin b), normalisiert. Als Referenz wurde dann der Ct-Wert in einem Ansatz ohne Restriktionsenzym verwendet. Der DNA-Methylierungsgrad in frisch isolierten HSZ wurde auf 100% gesetzt und der Wert an Tag 3 in Relation dazu ausgewertet.

### 3.3 Untersuchung der Genexpression

#### 3.3.1 Gen-Expressionsarray

Um einen umfassenden Überblick über die Genexpressionsveränderungen während der HSZ-Aktivierung zu bekommen, wurde ein Genexpressionsarray durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die HSZ aus drei Wistar-Ratten isoliert, wie unter 3.1 beschrieben kultiviert und nach 4 Stunden, einem Tag, drei Tagen und sieben Tagen geerntet. Die RNA-Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit nach Herstellerangaben. Die Durchführung des Arrays wurde von der *Genomic Core Facility* des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) übernommen und die Ergebnisse in Form von CEL-Dateien (*Affymetrix Probe Result File*) zur Verfügung gestellt. Die CEL-Dateien enthielten jeweils die Fluoreszenzintensitäten aller Sonden eines Microarray-Chips. Diese Dateien sind in der Datenbank *ArrayExpress* (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>) unter der Zugangsnummer E-MTAB-5404 hinterlegt. Der verwendete Genchip war der Affymetrix Genechip Rat Gene 2.0 ST. Zur Qualitätsanalyse und zur Auswertung der Ergebnisse wurden die von Affymetrix zur Verfügung gestellten Programme Expression Console™ Software, Version 1.4.1 sowie Affymetrix Transcriptome Analysis® Software, Version 3.0 verwendet. Expression Console™ wurde zum einen verwendet, um die

CEL-Dateien in CHP-Dateien umzuwandeln, diese enthielten dann die normalisierten Intensitätswerte der *Arrays*. Die Normalisierung erfolgte anhand von *Array*-internen Kontrollen. Des Weiteren wurden mit dieser Software die Qualität der durchgeführten *Arrays* bewertet. Dazu wurden die Hybridisierungskontrollen und die Verteilung der Signalintensitäten der einzelnen *Arrays* visualisiert sowie eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die in Expression Console™ erstellten CHP-Dateien wurden im Anschluss in Transcriptome Analysis® geöffnet. Diese Software ermöglichte die Visualisierung der normalisierten *Array*daten in einer *Heatmap*, außerdem war hier eine Darstellung der *Array*ergebnisse für einzelne Gene in Tabellenform möglich, dabei wurde jeweils der Mittelwert der drei biologischen Replikate dargestellt. Die Tabelle stellte die normalisierten Signalintensitäten sowie die Veränderung in der Genexpression zwischen zwei Beobachtungszeiträumen und die Signifikanz der Veränderung nach Durchführung einer gepaarten Varianzanalyse (ANOVA) dar. Diese Tabelle wurde zur Auswahl von Kandidatengenen genutzt, Gene mit einer mindestens zweifachen und signifikanten Zunahme bzw. Abnahme der Expression wurden im Folgenden weiter untersucht. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

### 3.3.2 RNA-Qualitätsanalyse

Die Qualität der für die Genexpressionsarrays eingesetzte RNA wurde durch mehrere Methoden überprüft. Zunächst wurde die RNA im Agarosegel auf Degradation und Verunreinigung mit genomischer DNA untersucht. Dazu wurden aus jeder Probe 250 ng RNA mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und zur Denaturierung eine Minute auf 70°C erhitzt. Im Anschluss wurden die Proben in einem 1% Agarosegel 20 Minuten lang in einem elektrischen Feld bei 150 V der Größe nach aufgetrennt. Das Gel wurde 15 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und das Signal nach 10 Minuten Entfärben im Wasserbad, mit dem UV-Detektionsgerät Gelstick Touch sichtbar gemacht und dokumentiert. Eine weitere Qualitätskontrolle umfasste die Umschreibung der RNA in komplementäre DNA (cDNA) und die Amplifikation von CD26 und  $\beta$ -Aktin in einer PCR. Die cDNA-Synthese ist in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Das angewendete PCR-Programm umfasste mehrere Zyklen 20 Sekunden Denaturierung (95°C), 20 Sekunden Primer-Annealing (58°C) und 30 Sekunden Elongation (72°C). Die Amplifikate wurden im Anschluss mit DNA-Ladepuffer versehen und im 2% Agarosegel aufgetrennt. Die Detektion erfolgte wie sie in diesem Kapitel (3.3.2) bereits für das RNA-Gel beschrieben wurde.

### 3.3.3 Quantitative PCR (qPCR)

Die Ergebnisse aus den Gen-Expressionsarrays wurden für einzelne Gene mittels quantitativer PCR (qPCR) verifiziert. Diese Methode beruht auf der fluorimetrischen Quantifizierung der Amplifikat-Menge nach jedem PCR-Zyklus. Für diese Experimente wurde RNA aus 0 Tage alten (frisch isoliert) und aus jeweils für einen (ruhend), drei (früh aktiviert) und sieben (spät aktiviert) Tage kultivierten HSZ

verwendet. Je 400 ng RNA wurden mit dem Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit in einem 20 µl Reaktionsansatz in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die entsprechende Menge an RNA zunächst mit dem Oligo (dT)-Primer und dem Hexamerprimer gemischt und zur Denaturierung der RNA 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Kühlung der Proben auf Eis wurden der Reaktionspuffer, die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), der RNase-Inhibitor und die reverse Transkriptase hinzugegeben (Tabelle 10). Nach 5 Minuten bei 37°C fand die Umschreibung für eine Stunde bei 42°C statt. Die Reaktion wurde durch die Inaktivierung der Enzyme bei 70°C für 10 Minuten beendet.

**Tabelle 10 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Umschreibung von RNA in cDNA**

Substanz	Volumen [µl]
RNA (400 ng)	Entsprechend der RNA-Konzentration
Oligo (dT)- Primer	1
Hexamerprimer	1
Reaktionspuffer	4
Desoxyribonukleosidtriphosphate	2
RiboLock RNase-Inhibitor	1
Reverse Transkriptase	1
H <sub>2</sub> O	Ad 20

Die Zusammensetzung des qPCR-Reaktionsansatzes ist in Tabelle 11 beschrieben.

Die Messung erfolgte am TOptical Cycler (Analytik Jena AG, Jena, Deutschland). Das PCR-Programm umfasste eine zehnminütige Aktivierung der Taq-Polymerase bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen aus 20 Sekunden Denaturierung (95°C), 20 Sekunden Primer-Annealing (58°C) und 30 Sekunden Elongation (72°C), abschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Qualität und Spezifität der Amplifikate zu beurteilen. Die Auswertung der Primärdaten erfolgte über die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak & Schmittgen, 2001). Grundlage dieser Methode ist die Annahme einer exponentiellen Amplifikation des Produkts. Für jede Probe wird ein *threshold cycle* (Ct)-Wert bestimmt, dies ist der PCR-Zyklus, in dem das Signal der Amplifikate einen festgesetzten Wert überschreitet. Dieser wird normalisiert auf den Ct-Wert eines Haushaltsgens in derselben Probe ( $\Delta Ct$ ).

**Tabelle 11 Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die quantitative PCR**

Substanz	Volumen [µl]
Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2x)	12,5
Vorwärtsprimer (10 µM)	1,5
Rückwärtsprimer (10 µM)	1,5
RNA	2,5

H <sub>2</sub> O	7
------------------	---

Für die vorliegende Arbeit wurde das Gen *ribosomal protein S6* (Rps6) als Haushaltsgen eingesetzt. Der  $\Delta\text{Ct}$ -Wert einer Referenz, in der vorliegenden Arbeit die Expression in ruhenden HSZ, wurde vom  $\Delta\text{Ct}$ -Wert der Proben von Tag 3 und Tag 7 der HSZ-Kultur abgezogen. Der Wert, der sich daraus ergab, wird als  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert bezeichnet. Die Annahme, dass die Effizienz der Amplifikation eins ist, führt dazu, dass die relative RNA-Menge in einer Probe =  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  ist. Die quantitativen PCR-Analysen wurden jeweils für sechs unabhängige biologische Replikate durchgeführt.

### 3.4 Gene ontology (GO)- Analyse

*Gene ontology* (GO)-Termini sind Genannotationen, welche die Zuordnung von Genen zu bestimmten biologischen Prozessen beschreiben. Diese Zuordnung ermöglicht es, einen Satz von Genen daraufhin zu untersuchen, ob bestimmte biologische Prozesse in diesem Satz im Vergleich zum gesamten Genom signifikant vermehrt repräsentiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Sets an Genen (vermehrt exprimiert, vermindert exprimiert, differentiell methyliert) einer GO-Analyse unterzogen. Dabei wurden nur die Gene in die Analyse einbezogen, die eine mindestens zweifache Veränderung in der Genexpression bzw. mindestens 20% Veränderung in der DNA-Methylierung zwischen den ruhenden und früh aktivierten HSZ aufwiesen. Die GO-Analyse wurde mithilfe des AmiGO 2, Panther Classification System 10.0 Internet-Tool durchgeführt (<http://pantherdb.org/>) durchgeführt.

### 3.5 Proteinanalysen

#### 3.5.1 Immunfluoreszenz

In der Immunfluoreszenz wird die Spezifität von Antikörpern genutzt, um in fixierten Zellen das Vorkommen und die Lokalisation von Proteinen oder von DNA-Modifikationen zu bestimmen. Dabei erfolgt die Markierung eines bestimmten Proteins oder anderen Antigens mithilfe eines spezifischen Primärantikörpers und der visuelle Nachweis über den Einsatz eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers, der spezifisch an den Primärantikörper bindet.

Zur Durchführung der Immunfluoreszenz wurden HSZ in 12-Well-Platten (1x10<sup>6</sup> HSZ pro Platte) auf runden Deckgläsern aus Glas (Ø18 mm) ausgebracht und unter den in 3.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Für die Ernte an Tag 1, 2 und 3 der Kultur wurden die Zellen für 5 min in eiskaltem Methanol fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 20 Minuten mit 0,5% Triton X-100 permeabilisiert. Zur Färbung von 5mC erfolgte zusätzlich eine Denaturierung der DNA für zwanzig Minuten mit 2 M Salzsäure (HCl). Dadurch verbesserte sich die Zugänglichkeit der DNA für den Antikörper. Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurde das Deckglas für 1 Stunde in 1% bovinem Serumalbumin

(BSA) blockiert, um unspezifische Bindestellen für den Antikörper zu maskieren. Die Inkubation mit dem in 1% BSA verdünnten Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer, die einzelnen Verdünnungen der Primärantikörper sind in Tabelle 7 aufgelistet. Nach drei zehnmütigen Waschschritten mit PBS mit 0,05% Tween 20 (PBST) wurden die Zellen mit dem in 1% BSA verdünnten Sekundärantikörper inkubiert. Im Anschluss an das erneute Waschen wurden die Deckgläser auf einem Objektträger mit dem Versiegelungsmedium *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* bzw. DAPI Fluoromount-G überschichtet. 4'-6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) wurde zur Gegenfärbung der DNA benötigt. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte am Mikroskop Olympus IX50 mit einer Fluoreszenzeinrichtung und der Digitalkamera DP71 sowie der Software CellF von Olympus.

### 3.5.2 Western Blot Analysen

#### 3.5.2.1 Proteingewinnung

Die HSZ für den Proteinnachweis im Western Blot wurden nach entsprechender Kulturzeit 2x mit PBS gewaschen und im Anschluss in 500 µl kaltem Protein-Lysepuffer (Tabelle 5) aufgenommen. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Danach wurde das Proteinlysate 6 Minuten bei 5000xg zentrifugiert und der Überstand, der das Gesamtprotein der lysierten Zellen enthielt, zur weiteren Analyse eingesetzt.

#### 3.5.2.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten erfolgte mittels Bradford-Assay. Die Bradford-Methode basiert auf der Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine zu binden und durch diese Bindung eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm zu durchlaufen (Bradford, 1976). Die Absorption bei 595 nm ist dabei proportional zur Proteinmenge. Das Proteinlysate wurde 1:200 mit dem Bradford-Reagenz gemischt und die Absorption bei 595 nm nach 5 Minuten in einem ELISA-Plattenreader gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysate erfolgte anhand der Absorptionswerte eines ebenfalls gemessenen BSA-Proteinstandards.

#### 3.5.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Dabei ist ihre elektrophoretische Mobilität umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Durch den gleichzeitigen Einsatz von Proteinstandards, die Proteine definierten Gewichts enthalten, lassen sich Rückschlüsse auf das Gewicht der zu untersuchenden Proteine ziehen. Die Gelelektrophorese erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Durch die



Komplexierung der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) sind bei dieser Methode alle Proteine negativ geladen und wandern während der Elektrophorese in Richtung Anode. Ein Sammelgel mit 4% Polyacrylamid und niedrigem pH (pH 6,8) dient der Aufkonzentrierung der Proteine in der Probe, das Trenngel mit einem höheren pH-Wert (pH 8,8) dient der Größentrennung der Proteine. Es wurden unterschiedliche Trenngele mit 8% bis 12,5% Polyacrylamid in Abhängigkeit von der Größe der zu untersuchenden Proteine eingesetzt. In allen Proben einer Western Blot Analyse wurde die gleiche Menge an Proteinlysate mit 1x Proteinladepuffer versehen und 5 Minuten im Wasserbad aufgeköcht. Die Proben wurden im Gel bei 150 V aufgetrennt, bis die gefärbte Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

#### 3.5.2.4 Proteintransfer und Immundetektion

Zur Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper wurden die aufgetrennten Proteine im Anschluss auf einer Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) immobilisiert. Zum Proteintransfer wurde das *Semidry*-Verfahren verwendet, der Transfer erfolgte für ein bis zwei Stunden bei 1 mA/cm<sup>2</sup>. Im Anschluss an den Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% fettfreier Milch bzw. 5% BSA je nach verwendetem Primärantikörper auf dem Schüttler inkubiert um freie Proteinbindestellen zu blockieren. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte stets über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Nach drei zehnmütigen Waschschritten in TBS mit 1% Tween zur Entfernung nicht gebundener Antikörper erfolgte dann für zwei Stunden die Inkubation mit einem *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur auf einem Schüttler. Die jeweils verwendeten Verdünnungen für Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die HRP oxidiert Substrat unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid zu einem Produkt, das Licht emittiert. Diese Lichtemission kann dann detektiert werden. Nach weiteren Waschschrritten wie oben beschrieben, erfolgte die Detektion mit chemilumineszenten HRP-Substraten der Firma Advansta am ChemiDoc-Detektionsgerät. Die spätere Quantifizierung der Signale wurde mittels der Software Alpha View SA Version 3.4.0 (Protein Simple, San Jose, CA, USA) durchgeführt.

### 3.6 BrdU-Zellproliferationsassay

Bromodesoxyuridin (BrdU) ist ein Pyrimidinanalog, das anstelle von Thymin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird und im Anschluss mittels spezifischer Antikörper detektierbar ist. Mithilfe des BrdU-Zellproliferationsassays sollte in der vorliegenden Arbeit die Proliferationshemmung von HSZ durch L-Mimosin kontrolliert werden. Dazu wurden auf 96-well-Platten 12.000 HSZ pro Well ausgebracht und in DMEM<sup>++</sup> mit 1 mM L-Mimosin bzw. PBS zur Kontrolle ein, zwei oder drei Tage kultiviert. Zur Analyse der Proliferation wurde das Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) Kit verwendet. Vor der Ernte der Zellen wurden diese 20 Stunden mit 10 µM BrdU inkubiert, das weitere

---

Vorgehen entsprach den Vorgaben im Handbuch des Assays. Die spezifische Bindung eines markierten Antikörpers an BrdU konnte im Anschluss bei 450 nm im ELISA-Plattenreader gemessen werden. Die Höhe der Absorption gab Auskunft über die Menge an BrdU das in die DNA eingebaut wurde und damit indirekt über die DNA-Synthese und die Proliferation der untersuchten Zellen.

### 3.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde in dieser Arbeit der t-Test durchgeführt, wenn zwei Messpunkte miteinander verglichen wurden. In einigen Fällen waren die Ergebnisse der Expressionsanalysen im t-Test nicht signifikant. Dies lag daran, dass die untersuchten biologischen Replikate bei den Expressionsveränderungen zwar die gleiche Tendenz (zunehmende/abnehmende Expression) aufwiesen, das Ausmaß dieser Veränderungen allerdings sehr unterschiedlich war. In diesen Fällen wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Beim Vorliegen multifaktorieller Daten wurde der ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni & Holm-Test durchgeführt. Der t-Test wurde mithilfe des Programms Graph Pad Quick Calcs (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>, 1.12.2016) durchgeführt. Zur Durchführung des Mann-Whitney U-Test wurde ebenfalls ein Internet-Tool verwendet ([http://www.socscistatistics.com /tests/mannwhitney/Default2.aspx](http://www.socscistatistics.com/tests/mannwhitney/Default2.aspx), 1.12.2016). Sowohl ANOVA- als auch Bonferroni & Holm-Test wurden mit folgendem Tool durchgeführt: [http://astatsa.com/OneWay\\_Anova\\_with\\_TukeyHSD/](http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/) ,1.11.2016). Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die Varianz der Werte ist jeweils als Standardfehler (+SEM) angegeben.

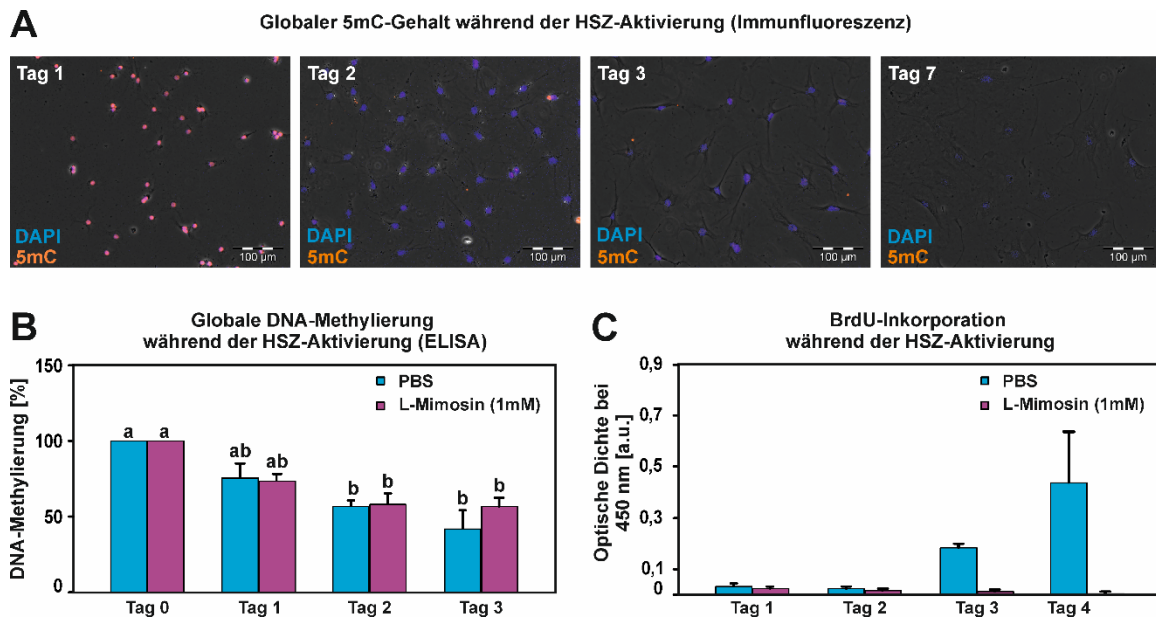
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Globale Dynamik der DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung

Eine erste Annäherung an die Dynamik der DNA-Methylierung während der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung erfolgte über die Bestimmung der globalen DNA-Methylierung. Diese gibt Auskunft über die Menge der zu einem bestimmten Zeitpunkt in einer Zelle bzw. in einem Zelllysate vorhandenen methylierten Cytosine. Zur Detektion dieser modifizierten Base wurden Antikörper verwendet, die spezifisch 5mC erkennen. Der Nachweis von 5mC erfolgte mittels Immunfluoreszenz an fixierten Zellen und mittels eines 5mC-ELISA in Zelllysaten.

Zwischen Tag 0 und Tag 3 bzw. Tag 7 der HSZ-Kultur zeigte sich sowohl im ELISA, als auch in den Immunfluoreszenzexperimenten eine sehr starke Abnahme der DNA-Methylierung. Eine nukleäre Bindung des Cy3-gekoppelten 5mC-Antikörpers war nur an Tag 1 deutlich sichtbar, an den Tagen 2, 3 und 7 war hingegen nur eine geringe Menge an Cy3-Fluoreszenz ersichtlich (Abbildung 5, A). Der durch die Immunfluoreszenz ermittelte Rückgang der DNA-Methylierung wurde durch einen ELISA bestätigt, denn die globale DNA-Methylierung fiel bis Tag 3 um etwa 60% ( $\pm 12,1\%$ ) des Ausgangswertes zurück (Abbildung 5, B).

Um beurteilen zu können, ob diese starke DNA-Demethylierung auf einem passiven, replikationsabhängigen oder einem aktiven, replikationsunabhängigen Mechanismus beruhte, wurden die HSZ während des Aktivierungsprozesses mit 1 mM des Replikationsinhibitors L-Mimosin behandelt (Abbildung 5, B). Die Hemmung der Replikation zeigte keinen Einfluss auf den DNA-Demethylierungsprozess. Dieser fand in den L-Mimosin-behandelten Zellen in vergleichbarem Maße wie in den PBS-behandelten Kontrollzellen statt, sodass von einer aktiven DNA-Demethylierung ausgegangen werden konnte. In einem Kontrollexperiment wurde überprüft, ob die HSZ unter L-Mimosin-Behandlung tatsächlich keine Proliferation aufwies. Mittels der Quantifizierung der BrdU-Inkorporation in neu synthetisierte DNA konnte gezeigt werden, dass L-Mimosin die Proliferation effektiv inhibierte (Abbildung 5, C). Zusätzlich konnte auch in den Kontrollzellen, ohne Einsatz von L-Mimosin, erst am dritten Tag der Kultur eine relevante DNA-Synthese detektiert werden (Abbildung 5, C). Dies war ein weiterer Hinweis darauf, dass die DNA-Demethylierung während der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung durch einen aktiven Mechanismus erfolgte.

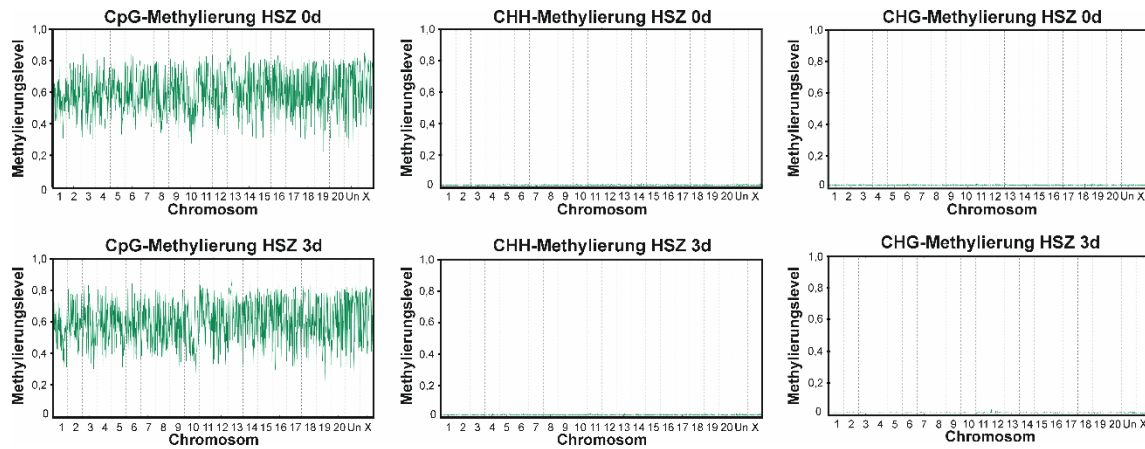


**Abbildung 5: Dynamik der globalen DNA-Methylierung während der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung.** (A) Immunfärbung von methyliertem Cytosin (5mC, orange) in fixierten HSZ an den Tagen 1, 2, 3 und 7 nach Isolation. Der Gehalt an 5mC ging zwischen Tag 1 und Tag 2 stark zurück. Die DNA in den Zellkernen wurde mit DAPI (blau) gefärbt. Die beschriebene Immunfärbung wurde in drei unabhängigen Proben durchgeführt. Abgebildet ist eine repräsentative Immunfärbung von 5mC. (B) Quantifizierung des 5mC-Gehalts in HSZ-Zelllysaten mittels ELISA. Der 5mC-Gehalt an Tag 0 wurde auf 100% gesetzt und die Messungen an den darauffolgenden Tagen in Relation dazu gesetzt. Die Zellen wurden entweder mit 1 mM L-Mimosin oder PBS (Kontrolle) behandelt. Die DNA-Methylierung ging in beiden Fällen von Tag 0 bis Tag 3 um etwa 60% ( $\pm 12,1\%$ ) der ursprünglichen Methylierung zurück. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA-Test), gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen entsprechen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Varianz ist als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=3$ ). (C) Zur Kontrolle der Proliferationshemmung durch L-Mimosin wurde die BrdU-Inkorporation während des Experiments unter (B) mittels ELISA quantifiziert. In den Kontrollzellen stieg das BrdU-Signal erst ab Tag 3 an. L-Mimosin konnte die Proliferation effektiv unterdrücken. Diese Kontrolle wurde für jedes Experiment einzeln durchgeführt, gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel. Abbildung modifiziert aus Götze *et al.* (2015). (BrdU: Bromdesoxyuridin, DAPI: 4'-6-Diamidin-2phenylindol, ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*; HSZ: Hepatische Sternzellen, 5mC: 5-Methylctosin)

## 4.2 Genomweite Dynamik der DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung

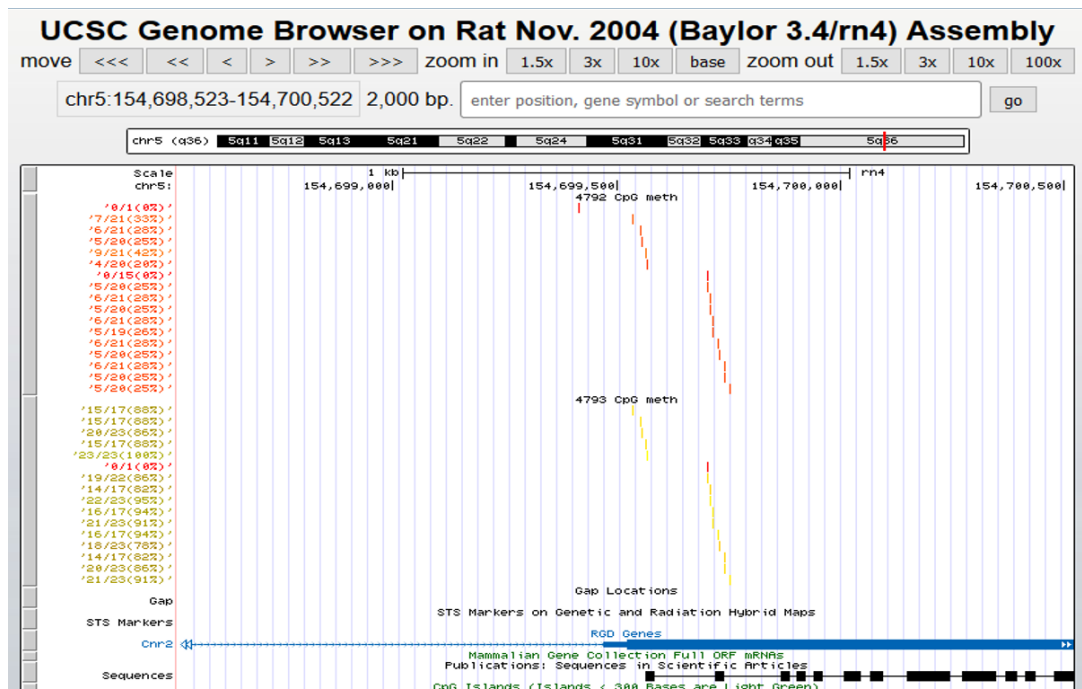
Die Bestimmung der globalen DNA-Methylierung gibt keine Auskunft darüber, in welchen Bereichen des Genoms die Veränderungen der DNA-Methylierung auftreten und welche Gene dadurch beeinflusst werden. Diese Information ist zur Beurteilung funktioneller Konsequenzen allerdings sehr wichtig. Zur Identifikation der differentiell methylierten CpGs in basengenaue Auflösung wurde der Methyl-MiniSeq Service von Zymo Research genutzt. Frisch isolierte und FACS-sortierte HSZ (Tag 0) und 3 Tage Kultur-aktivierte HSZ wurden in diesem Assay auf Unterschiede in der DNA-Methylierung hin untersucht. Die Qualitätsanalyse des Assays erfolgte durch Zymo Research und zeigte deutlich, dass der Assay methylierte CpG-, aber nicht CHG- oder CHH-Dinukleotide detektiert hat, wobei H für Adenin

oder Thymin stehen kann (Abbildung 6). Die Verteilung der Signale über die unterschiedlichen Chromosomen weist nach, dass CpG-Dinukleotide auf allen Chromosomen untersucht wurden.



**Abbildung 6: Qualitätskontrolle Methyl-MiniSeq.** Dargestellt ist jeweils das Methylierungslevel der unterschiedlichen chromosomalen Positionen in CpG-, CHH- und CHG-Dinukleotiden in den untersuchten Proben HSZ 0d und HSZ 3d. H steht dabei für die Basen Adenin oder Thymin. Der Assay hat spezifisch CpG-Methylierungen detektiert. Die Abbildungen wurden durch den Service von Zymo Research bereitgestellt und zugunsten einer besseren Lesbarkeit modifiziert. Abbildung teilweise publiziert in Götze *et al.* (2015). (CpG: Cytosin-Guanin, HSZ: Hepatische Sternzellen)

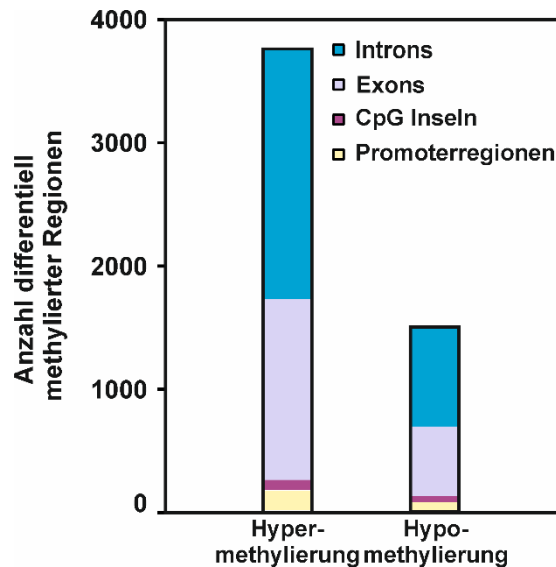
Die von Zymo Research bereitgestellten Daten beinhalteten Informationen über die genaue chromosomale Positionen der identifizierten, differentiell methylierten Regionen (DMR), den Namen des assoziierten Gens, sowie die Anzahl der Sequenzierungsdurchläufe und die mittlere DNA-Methylierung in dieser Region für jede Probe. Die Differenz aus den mittleren DNA-Methylierungen der frisch isolierten und früh aktivierten HSZ ergab das Ausmaß der differentiellen Methylierung, wobei positive Werte einer Abnahme und negative Werte einer Zunahme der DNA-Methylierung entsprachen. Zusätzlich wurde in den bereitgestellten Daten auch die Signifikanz des detektierten Unterschieds durch Angabe des p-Wertes bewertet. Mithilfe der chromosomalen Position ließ sich jede differentiell methylierte Region in einem Genombrowser im genomischen Kontext darstellen. Für diese Arbeit wurde der Genombrowser der University of California Santa Cruz verwendet (<https://genome.ucsc.edu>). Beispielhaft für die Darstellung der Ergebnisse in diesem Genombrowser wurde das Gen Cannabinoidrezeptor 2 (Cnr2) auf Chromosom 5 gewählt (Abbildung 7). Die Ansicht gibt Auskunft über die Lage der DMR im Gen. In diesem Fall lagen die untersuchten CpG-Dinukleotide im Promoterbereich. Die untersuchten CpGs sind als vertikale Striche angezeigt, die Zahlen auf der linken Seite beziehen sich auf diese CpGs und geben Auskunft über die Anzahl der Sequenzierungsdurchläufe insgesamt sowie die Anzahl der Sequenzierungen, bei denen ein methyliertes CpG detektiert wurde. Daraus errechnet sich eine relative DNA-Methylierung für ein untersuchtes Dinukleotid. Aus allen Dinukleotiden, die in der jeweiligen Probe, Tag 0 bzw. Tag 3, in dieser Region untersucht wurden, ergibt sich die in den Daten angegebene relative, mittlere DNA-Methylierungsdifferenz.



**Abbildung 7: Darstellung der Methylomdaten im UCSC Genombrowser.** Die DNA-Methylierung der frisch isolierten HSZ (Tag 0, Probe 4792) und der früh aktivierten HSZ (Tag 3, Probe 4793) lässt sich im Genombrowser im genomischen Kontext darstellen. Als Beispiel wurde hier das Gen Cannabinoidrezeptor 2 (Cnr2) auf Chromosom 5 gewählt. In Blau ist im unteren Teil des Bildes ein Teil des Gens und seine Transkriptionsrichtung zu erkennen. Darüber sind die untersuchten CpG-Dinukleotide in den zwei Proben zu sehen, jeder vertikale Strich entspricht einem CpG-Dinukleotid. Die CpG-Dinukleotide liegen im Promoterbereich des Gens. Der Methylierungsstatus ist farbkodiert, rot steht für eine geringe, gelb für eine starke Methylierung. Zusätzlich ist an der linken Seite für jedes CpG angegeben wie oft ein Sequenzierungsdurchlauf für dieses CpG-Dinukleotid durchgeführt wurde und wie oft es als methyliert erfasst wurde. Daraus ergibt sich eine prozentuale DNA-Methylierung für das untersuchte CpG-Dinukleotid. Die Abbildung ist ein Screenshot von der Seite [https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=rn4&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A154698523%2D154700522&hgid=523514361\\_JNkXK2UjCDIiV9UY0Bkv8AqvKOW](https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=rn4&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A154698523%2D154700522&hgid=523514361_JNkXK2UjCDIiV9UY0Bkv8AqvKOW) vom 27.09.2016. (Cnr2: Cannabinoidrezeptor 2, CpG: Cytosin-Guanin, HSZ: Hepatische Sternzellen)

Für die weitere Auswertung der Daten wurden nur die DMR verwendet, die zwischen Tag 0 und Tag 3 der Kultur einen signifikanten und mindestens 20%igen Unterschied in der DNA-Methylierung aufwiesen. Während der HSZ-Aktivierung zeigte sich deutlich, dass Veränderungen der DNA-Methylierung im Genkörper viel häufiger auftraten als in Promotoren (Abbildung 8). Während 248 der identifizierten DMR in Promoterbereichen lokalisiert waren, traten in den Genkörpern, zu denen Introns, Exons und CpG-Inseln gezählt wurden, insgesamt 5017 DMR auf. Des Weiteren zeigte sich, dass die Mehrheit der DMR im Zuge des Aktivierungsprozesses eine zunehmende DNA-Methylierung erfuhren (Abbildung 8). Im Promoterbereich wurden 163 Regionen hypermethyliert, aber nur 85 hypomethyliert. Dieses Muster zeigte sich auch bei der Untersuchung von DMR im Genkörper,

während 3592 DMR eine zunehmende Methylierung aufwiesen, fand in 1425 Regionen eine DNA-Demethylierung statt.



**Abbildung 8: Differenziell methylierte Regionen während der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung.** Dargestellt sind alle differenziell methylierten Regionen mit einem signifikanten und mindestens 20%igen Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen Tag 0 und Tag 3 der HSZ-Aktivierung. Die dargestellten Ergebnisse wurden über den Methyl-MiniSeq Assay von Zymo Research ermittelt. Die linke Säule fasst alle differenziell methylierten Regionen zusammen, die eine zunehmende DNA-Methylierung aufwiesen, wohingegen in der rechten Säule alle hypomethylierten Regionen dargestellt sind. Die Regionen wurden jeweils unterschieden nach Introns, Exons, CpG-Inseln und Promoterregionen. Während der HSZ-Aktivierung traten häufiger Hyper- als Hypomethylierungen der DNA auf, außerdem lagen die Veränderungen vor allem in intergenen Bereichen. Abbildung modifiziert aus Schumacher *et al.* (2017). (CpG: Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid, HSZ: Hepatische Sternzellen)

### 4.3 Gene ontology (GO)-Analyse

Um Hinweise auf die funktionellen Konsequenzen dieser Veränderungen zu bekommen, wurde eine GO-Analyse durchgeführt. Diese kann bestimmen, ob in einer definierten Gruppe von Genen bestimmte biologische Funktionen im Vergleich zum gesamten Genom überrepräsentiert sind. Die GO-Analyse der differenziell methylierten Gene (DMG) ergab, dass von 3180 analysierten DMG 820 Gene mit der Funktion Zelldifferenzierung assoziiert waren (Tabelle 12). Des Weiteren waren 689 Gene an Stressreaktionen beteiligt. Außerdem traten Veränderungen der DNA-Methylierung in Genen auf, die in den Funktionen Zellmigration (300), Regulation der Sekretion (259), Wundheilung (109) und der Organisation der extrazellulären Matrix (64) eine Rolle spielen. Diese Auswertung lieferte einen Überblick darüber, welche Prozesse während der HSZ-Aktivierung wichtig sind, da diese sehr stark epigenetisch kontrolliert wurden. In der oben dargestellten Auswertung wurden nur die biologischen Funktionen berücksichtigt, die eine sinnvolle Aussage über die funktionelle Relevanz zulassen, sehr allgemein gefasste biologische Funktionen wie „zelluläre Prozesse“ wurden nicht mit in die Analyse

genommen. Ebenso wurden sehr spezielle Funktionen wie „Migration Epithelzellen“ nicht berücksichtigt und stattdessen übergeordnete Begriffe wie „Zellmigration“ ausgewertet.

**Tabelle 12: Wichtige biologische Funktionen differentiell methylierter Gene während der HSZ-Aktivierung.** Die Tabelle fasst die wichtigsten biologischen Funktionen zusammen, welche die Gene in den differentiell methylierten Regionen laut *gene ontology*-Analyse erfüllen. Neben der Anzahl der Gene dieser Gruppe, die einer bestimmten Funktion zugeordnet werden konnten, wurde außerdem die -x-fache Anreicherung dieser Funktion im Vergleich zum Gesamtgenom und die Signifikanz angegeben. Tabelle modifiziert aus Schumacher *et al.* (2017).

Biologische Funktion	Anzahl Gene	x-fache Anreicherung	p-Wert
<b>Zelldifferenzierung</b>	820	1,45	5,88E-31
<b>Stressreaktionen</b>	689	1,37	1,23E-17
<b>Prozesse des Immunsystems</b>	433	1,36	7,31E-09
<b>Zellmigration</b>	300	1,74	2,78E-20
<b>Regulation der Sekretion</b>	259	1,59	2,87E-12
<b>Wundheilung</b>	109	1,79	2,47E-06
<b>Organisation der EZM</b>	64	2,00	4,43E-05

#### 4.4 Dynamik der Genexpression während der HSZ-Aktivierung

Da die DNA-Methylierung an der Regulation der Genexpression beteiligt ist, ergab sich im Anschluss an die Untersuchung der DNA-Methylierung die Frage, wie sich die Genexpression während der HSZ-Aktivierung verändert. Dazu wurden Affymetrix GeneChip Rat Gene 2.0 ST Genexpressionsarrays durchgeführt. Die Genexpression wurde in RNA-Proben von frisch isolierten HSZ (Tag 0), sowie kultivierten HSZ (1 Tag, 3 Tage, 7 Tage) ermittelt und miteinander verglichen.

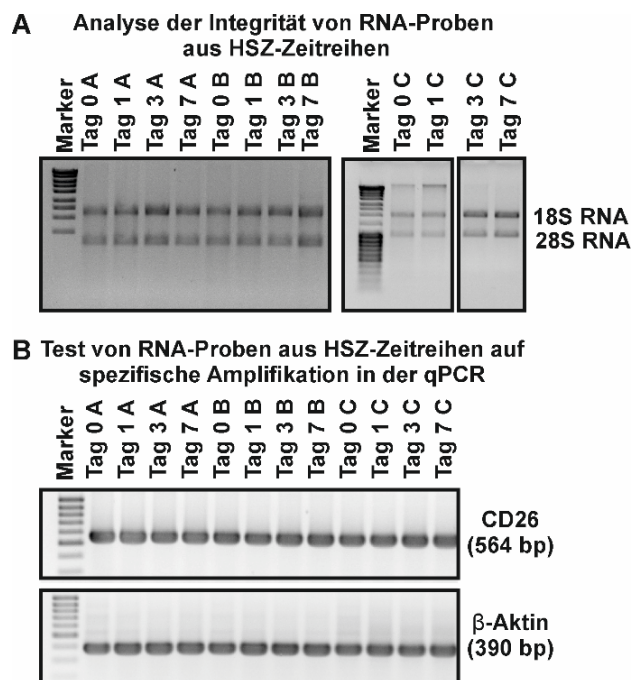
##### 4.4.1 Qualitätsanalyse der Arraydaten

Zunächst wurde die Qualität der aus drei HSZ-Zeitreihen isolierten RNA getestet. Dazu wurde die RNA im 1% Agarosegel aufgetrennt, um eine mögliche Degradation feststellen zu können. In allen Proben waren klare Signale für die dominante 28S- und 18S-RNA zu erkennen, es waren keine weiteren Signale von Molekülen mit geringerem Molekulargewicht zu finden, sodass eine Degradation der RNA ausgeschlossen werden konnte (Abbildung 9, A). Zur weiteren Beurteilung der RNA-Integrität wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mittels zweier Primerpaare für die Transkripte  $\beta$ -Aktin und CD29 überprüft, ob in einer PCR spezifische Amplifikate entstehen. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte nach Auftrennung der Amplifikate im 2% Agarosegel. Aus allen Proben konnten beide Produkte spezifisch amplifiziert werden (Abbildung 9, B).

Die Qualitätsanalyse der Ergebnisse der Genexpressionsarrays wurde mit Hilfe der Software Expression Console von Affymetrix durchgeführt. Die Analyse bestand aus drei Bereichen, zum einen



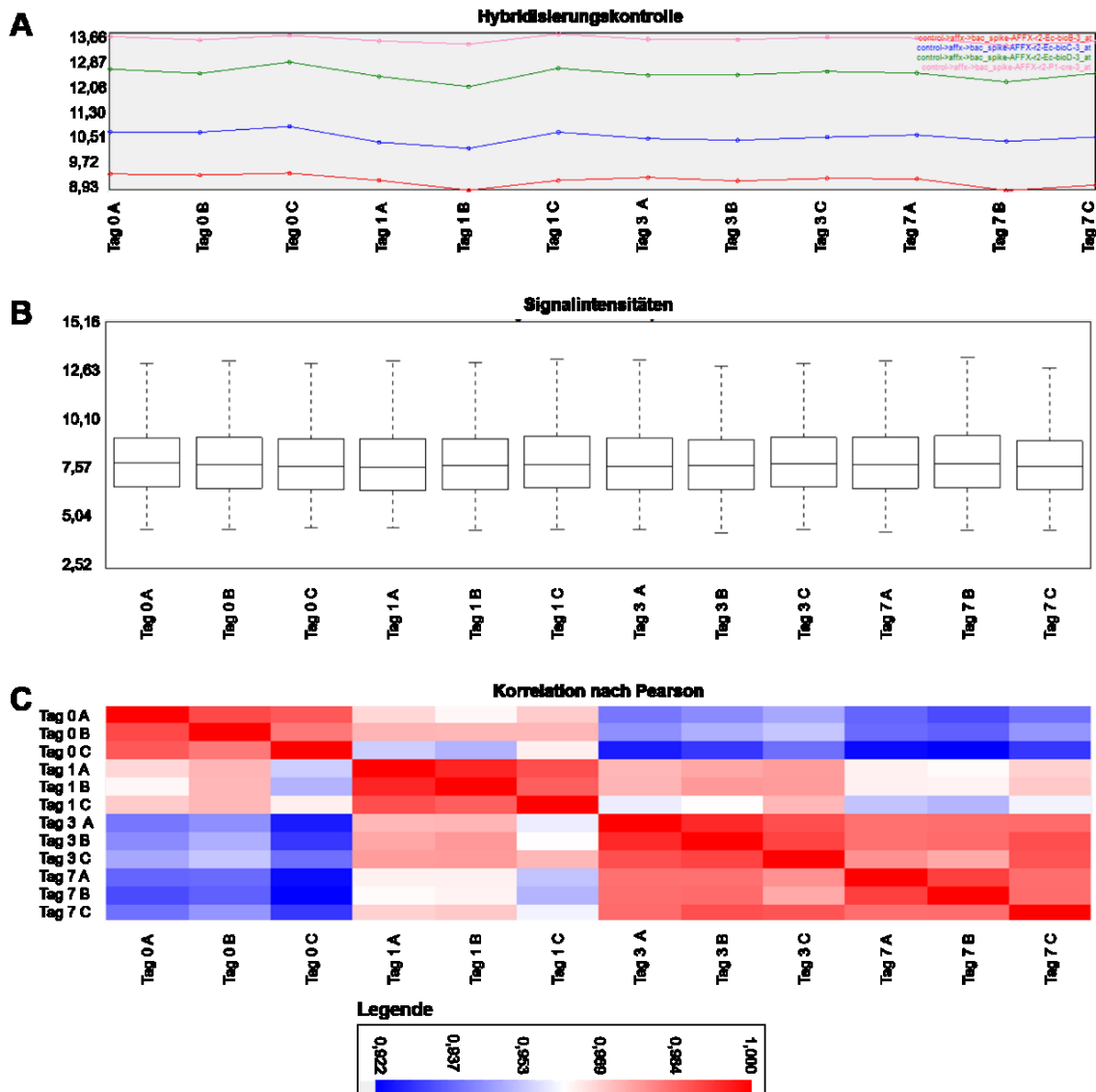
besaßen die verwendeten *Arrays* interne Kontrollen zur Überprüfung der allgemeinen Funktionalität, dazu gehörten beispielsweise Hybridisierungskontrollen.



**Abbildung 9: Qualitätsanalyse der RNA-Proben für den Genexpressionsarray.** Die RNA-Proben aus drei HSZ-Zeitreihen (Tag 0, 1, 3, 7) wurden vor der Verwendung in Genexpressionsarrays auf ihre Qualität überprüft. **(A)** Bestimmung der RNA-Degradation im 2% Agarosegel. In allen Proben waren die 18S-, sowie die 28S-RNA und keine RNA-Degradationsprodukte zu sehen. Die Proben Tag 0 C und Tag 1 C wiesen zusätzlich geringe Mengen an genomischer DNA auf. **(B)** Nach cDNA-Generierung aus den RNA-Lysaten konnten CD26 und  $\beta$ -Aktin in allen Proben spezifisch amplifiziert werden. (cDNA: komplementäre DNA, HSZ: Hepatische Sternzellen)

Des Weiteren wurde die Verteilung der Signalintensitäten innerhalb eines *Arrays* bewertet und in Relation zu den anderen *Arrays* gesetzt, die miteinander verglichen werden sollten. Wenn man mehrere Genexpressionsarrays miteinander vergleichen will, müssen die Signalintensitäten in den *Arrays* einander entsprechen. Zusätzlich wurden Analysen durchgeführt, welche die Daten verschiedener *Arrays* miteinander vergleichen, um so beispielsweise Gruppen mit unterschiedlichen Merkmalen zu bilden oder die Korrelation von Replikaten zu überprüfen. Dazu wurde die Korrelation nach Pearson bestimmt, die den linearen Zusammenhang zwischen den Proben bewertete. Zur Hybridisierungskontrolle wurden der eigentlichen Probe RNA-Transkripte für verschiedene Proteine der Biotin-Synthese in *E.coli* und für die Cre-Rekombinase des P1 Bakteriophagen in bekannten Konzentrationen zugesetzt. Diese Transkripte konnten nur an bestimmte bakterielle Kontrollsonden und nicht an die Ratten-spezifischen Sonden des *Arrays* binden. Die Menge dieser Kontrolltranskripte war bekannt, sodass anhand der detektierten Signalintensität an den Kontrollsonden Rückschlüsse auf die Hybridisierungseffizienz der *Arrays* gezogen werden konnten. Nach Vorgaben der Firma Affymetrix sollte das Transkript BioB die geringste und Cre die höchste Signalintensität aufweisen, dazwischen

sollten in aufsteigender Reihenfolge BioC und BioD liegen. Diese Unterschiede in den Signalintensitäten der Kontrolltranskripte konnten für alle zwölf durchgeführten *Arrays* nachgewiesen werden (Abbildung 10, A). Außerdem wiesen die zwölf *Arrays* für alle Hybridisierungskontrollen eine vergleichbare Signalintensität auf. Es kann daher für alle Genexpressionsarrays von einer guten Hybridisierungsqualität ausgegangen werden.



**Abbildung 10: Qualitätsanalyse Affymetrix Genechip Rat Gene 2.0 ST Expressionsarrays.** Die Qualitätsanalysen wurden mit dem Programm Expression Console von Affymetrix durchgeführt. **(A)** Die Signale der internen Hybridisierungskontrollen wiesen eine vergleichbare Hybridisierungseffizienz für alle zwölf Arrays nach. Außerdem war die Signalstärke der Arrays proportional zur RNA-Menge. **(B)** Die mittleren Signalintensitäten aller Arrays waren ähnlich, daher waren die Arrays gut untereinander vergleichbar. **(C)** Die Bestimmung der Korrelation nach Pearson zeigte, dass die biologischen Replikate gut miteinander korrelierten, wohingegen die Proben für unterschiedliche Zeitpunkte gut voneinander abzugrenzen waren.

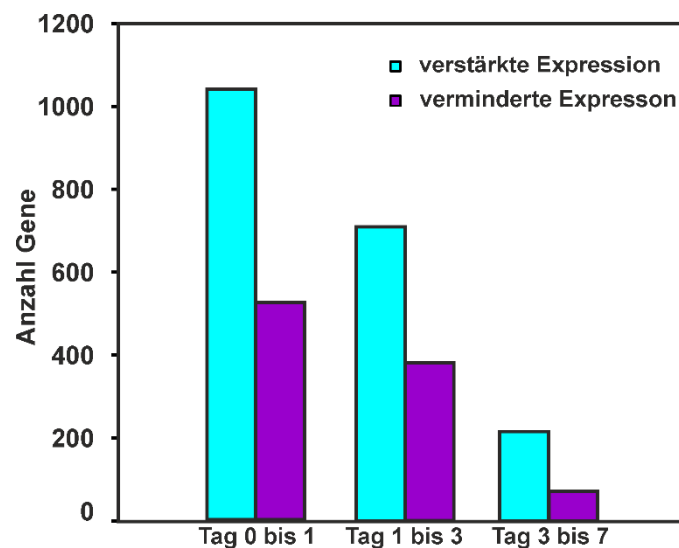
Die Darstellung der nicht normalisierten Signalintensitäten in einem Box-Plot-Diagramm zeigte, dass die zwölf *Arrays* eine vergleichbare Verteilung ihrer Signalintensitäten aufwiesen und es keine

auffällige Abweichung von dieser Verteilung gab (Abbildung 10, B). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Qualität der Signaldetektion in allen *Arrays* zufriedenstellend war.

Alle zwölf *Arrays* wurden weiter hinsichtlich ihrer Korrelation untersucht. Dabei wurde klar ersichtlich, dass die Replikate untereinander einen sehr hohen Korrelationswert aufwiesen, wohingegen zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten eine deutlich geringere Korrelation zu erkennen war. Dabei war die Korrelation zwischen Tag 0 und Tag 1, sowie Tag 3 und Tag 7 jeweils stärker, als die zwischen Tag 0 und Tag 3 bzw. 7 oder zwischen Tag 1 und den Tagen 3 und 7 (Abbildung 10, C).

#### 4.4.2 Differentielle Genexpression während der HSZ-Aktivierung

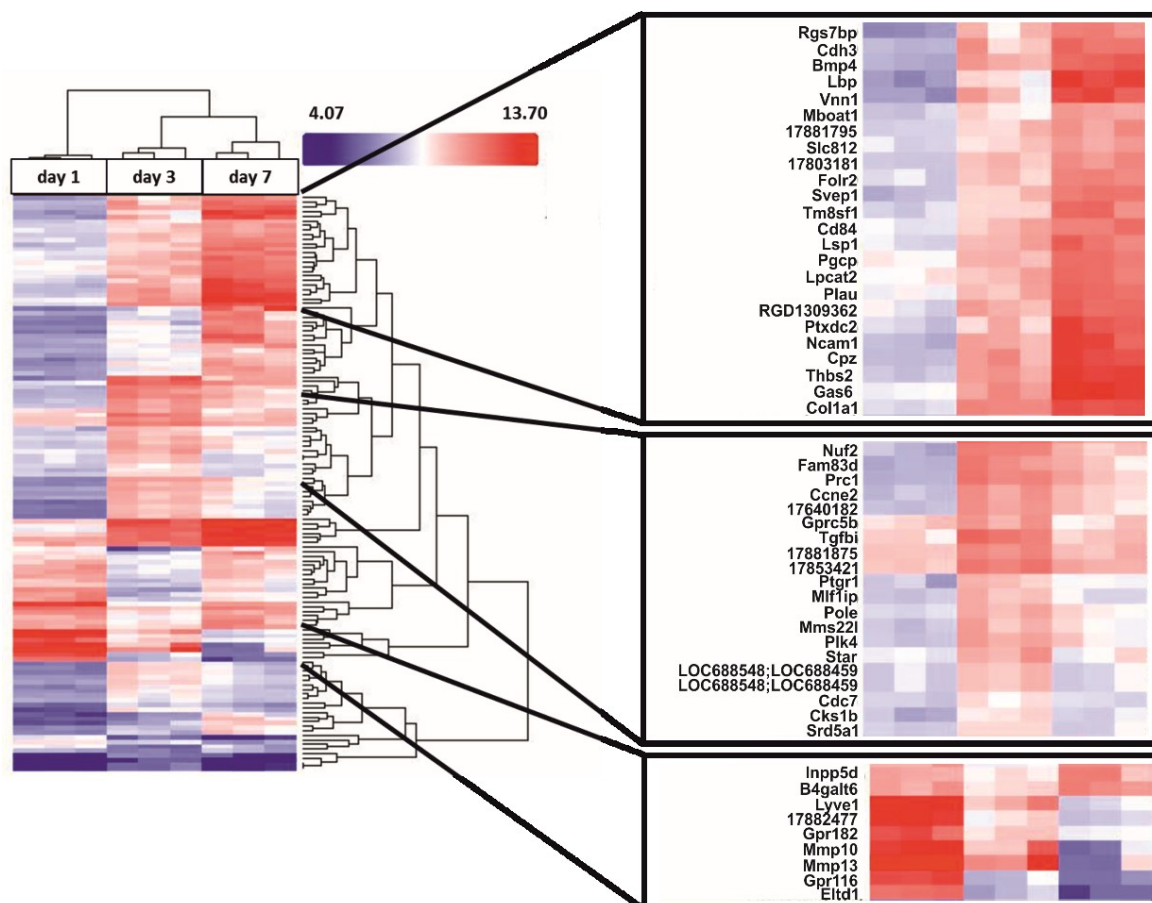
Insgesamt wurde die Expression von 30.429 Genen im Rattengenom untersucht. In der hier aufgeführten Analyse der Daten wurden nur die Gene berücksichtigt, die eine signifikante und mindestens zweifache Veränderung in der Genexpression zwischen zwei aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten aufwiesen. Die Mehrheit der Gene zeigte während der HSZ-Aktivierung eine verstärkte Expression (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Differentielle Genexpression während der HSZ-Aktivierung.** Für die Beobachtungszeiträume Tag 0 bis 1, Tag 1 bis 3 und Tag 3 bis 7 wurde jeweils die Anzahl verstärkt bzw. vermindert exprimierter Gene in den Affymetrix Genexpressionsarrays aufgetragen. Dabei wurden nur die Gene berücksichtigt, die eine signifikante und mindestens zweifache Veränderung der Genexpression aufwiesen. Insgesamt wurde eine höhere Anzahl an Genen verstärkt als vermindert exprimiert. Abbildung modifiziert aus Schumacher *et al.*, 2017. (HSZ: Hepatische Sternzellen)

Zudem war auffällig, dass die Anzahl der differentiell exprimierten Gene im Verlauf des Aktivierungsprozesses stetig abnahm, die stärksten Veränderungen im Transkriptom fanden im frühen Aktivierungsstadium statt. Zwischen den Tagen 0 und 1 erfuhren 1042 Gene eine vermehrte Expression, während gleichzeitig 528 Gene vermindert exprimiert wurden. Im darauffolgenden

Beobachtungszeitraum zwischen den Tagen 1 und 3 wurden 709 Gene verstärkt und 381 Gene vermindert exprimiert. In der späteren Aktivierungsphase zwischen Tag 3 und 7 wurden lediglich 215 Gene in ihrer Expression hochreguliert und 71 Gene herunterreguliert (Abbildung 11). Für die weiteren Auswertungen wurden die Ergebnisse für frisch isolierte HSZ (Tag 0) nicht weiter berücksichtigt, da frühere quantitative PCR-Analysen gezeigt haben, dass in diesen Zellen die zur Normalisierung verwendeten Haushaltsgene differentiell exprimiert werden (Lakner *et al.*, 2010) und daher nur bedingt für eine verlässliche Normalisierung herangezogen werden können. Da nicht bekannt war, welche Haushaltsgene im Rahmen des Chips zur Normalisierung verwendet wurden und wie deren Expression im Verlauf der HSZ-Aktivierung war, wurde auf einen Vergleich der Ergebnisse an Tag 0 mit den Proben darauffolgender Tage verzichtet.



**Abbildung 12: Heatmap der differentiell exprimierten Gene während der HSZ-Aktivierung.** Die Heatmap fasst die Ergebnisse der Genexpressionsarrays auf eine übersichtliche Weise zusammen. Auf der linken Seite ist das Expressionsverhalten aller signifikant differentiell exprimierten Gene mit einer mindestens zweifachen Veränderung während der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung zwischen Tag 1, Tag 3 und Tag 7 dargestellt. Dabei ist das Maß der Expression farbkodiert, Blau bedeutet eine geringe Expression, der Farbwechsel über Weiß zu Rot weist eine ansteigende Expression nach. Auf der rechten Seite sind einzelne Gruppen vergrößert dargestellt. In dieser Ansicht lässt sich auch erkennen, um welche Gene es sich handelt. Die Abbildung wurde mit dem Programm Transcriptome Analysis Console von Affymetrix erstellt. Abbildung modifiziert aus Schumacher *et al.*, (2017). (HSZ: Hepatische Sternzellen)

Zur übersichtlichen Darstellung wurde das Expressionsverhalten der HSZ an Tag 1, 3 und 7 in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 12). In dieser Darstellung ist die Expression für jedes einzelne untersuchte Gen farbkodiert, wobei Blau einer geringen Expression entspricht und der Farbverlauf über Weiß zu Rot eine zunehmende Expression darstellt. Über die *Heatmap* ließen sich Gruppen von Genen erkennen, die im Zuge der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung ein ähnliches Expressionsmuster zeigten. Einzelne Gruppen wurden zur detaillierteren Ansicht vergrößert dargestellt (Abbildung 12). Die obere Gruppe zeigte eine kontinuierliche Zunahme in der Expression von Tag 1 bis Tag 7. Die Gene in dieser Gruppe waren beispielsweise mit Differenzierungsvorgängen (z.B. *bone morphogenetic protein 4*, *Bmp4*) (Hogan, 1996), regenerativen Prozessen (z.B. *growth arrest specific protein 6*, *Gas6*) (Ferrero *et al.*, 1994) oder dem in der Entwicklungsbiologie wichtigen Wnt-Signalweg (z.B. *Cadherin-3*) (Samuelov *et al.*, 2012) assoziiert. Auch Gene die mit Prozessen des Immunsystems verknüpft sind (z.B. Lipopolysaccharid Bindeprotein *CD84*) (Sintes *et al.*, 2010), konnten sich in dieser Gruppe finden lassen. Die mittlere Gruppe umfasste Gene, die an Tag 3 temporär in ihrer Expression hochreguliert wurden und deren Expression an Tag 7 schon wieder unter dem Wert für Tag 3 lag. Zu dieser Gruppe gehörten Gene die an der Regulation des Zellzyklus (z.B. Kinetochorprotein *Nuf2*, *methyl-methansulfate sensitiv protein 22-like*, *Mml22*) (Nabetani *et al.*, 2001; Piwko *et al.*, 2010) beteiligt sind.

**Tabelle 13: Wichtige biologische Funktionen differentiell exprimierter Gene.** Die Tabelle fasst die wichtigsten biologischen Funktionen zusammen, denen die während der Aktivierung von Hepatischen Sternzellen differentiell exprimierten Gene zugeordnet werden konnten. Neben der Anzahl der Gene, die einer Funktion zugeordnet werden konnten, wurde außerdem die -x-fache Anreicherung dieser Funktion im Vergleich zum Gesamtgenom und die Signifikanz der Anreicherung angegeben. Tabelle modifiziert aus Schumacher *et al.* (2017).

Biologische Funktion	Anzahl Gene	x-fache Anreicherung	p-Wert
<b>Gene mit verstärkter Expression</b>			
<b>Stressreaktionen</b>	147	1,89	1,67E-10
<b>Zelldifferenzierung</b>	144	1,67	2,37E-06
<b>Zellzyklus</b>	92	4,73	1,30E-30
<b>Zellmigration</b>	40	2,29	1,4E-02
<b>Organisation der EZM</b>	29	>5	4,53E-10
<b>Regulation der Sekretion</b>	28	2,78	1,51E-02
<b>Wundheilung</b>	26	2,96	1,14E-02
<b>Gene mit verminderter Expression</b>			
<b>Zelldifferenzierung</b>	103	2,29	1,40E-12
<b>Stressreaktionen</b>	78	1,92	8,49E-05
<b>Prozesse des Immunsystems</b>	54	2,47	6,90E-08
<b>Zellmigration</b>	40	4,08	7,40E-10
<b>Regulation der Sekretion</b>	27	2,66	4,17E-02

Für die zwischen Tag 1 und 3 differentiell exprimierten Gene wurde im Anschluss, wie für die differentiell methylierten Gene auch eine GO-Analyse durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass erneut

viele der differentiell exprimierten Gene der biologischen Funktion „Zelldifferenzierung“ (144 bzw. 103) zuzuordnen waren (Tabelle 13).

Stark hochreguliert waren außerdem Gene, die mit Stressreaktionen (147) assoziiert sind, eine Rolle im Zellzyklus (92), bei der Zellmigration (40), der Organisation der extrazellulären Matrix (29), der Regulation von Sekretion (28) und der Wundheilung (26) haben. Auch unter den vermindert exprimierten Genen fanden sich Gene, die an Stressreaktionen (78), Zellmigration (40) und Regulation der Sekretion (27) beteiligt sind. Interessanterweise wurden mit Prozessen des Immunsystems assoziierte Gene nur vermindert exprimiert (54), in der Gruppe der verstärkt exprimierten Gene war diese biologische Funktion nicht zu finden.

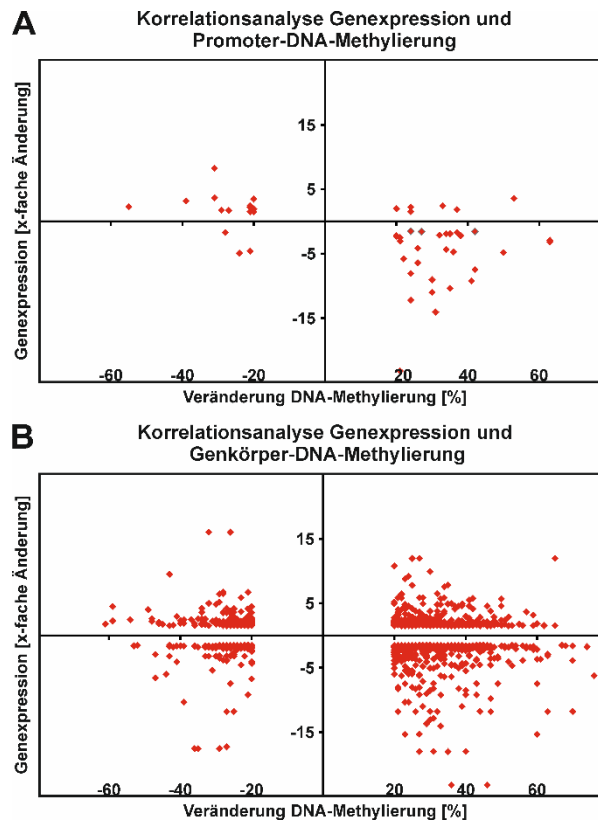
#### 4.5 Korrelationsanalyse DNA-Methylierung und Genexpression während der HSZ-Aktivierung

In der Literatur ist hinreichend beschrieben, dass DNA-Methylierungen im Promoter mit transkriptioneller Repression, DNA-Methylierungen im Genkörper hingegen mit transkriptionell aktiven Genen assoziiert sind (Jones, 1999; Murrell *et al.*, 2001; Hansen & Gartler, 1990; Mohandas *et al.*, 1981). Anhand der Ergebnisse aus dem Methyl-MiniSeq DNA-Methylierungsarray und dem Affymetrix Genexpressionsarray wurde überprüft, ob diese Verhältnisse auch während der HSZ-Aktivierung bestehen.

Dafür wurden alle Gene verwendet, die eine signifikante Veränderung in der DNA-Methylierung von mindestens 20% sowie gleichzeitig eine signifikante und mindestens zweifache Expressionsveränderung aufwiesen. Diese Gene wurden in einem Graphen gegeneinander aufgetragen (Abbildung 13). Die zuvor genannten Kriterien trafen auf insgesamt 51 Gene mit einer veränderten DNA-Methylierung im Promoterbereich zu (Abbildung 13, A).

Für 82 % der Gene ließ sich eine negative Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Genexpression nachweisen, 57% der Gene wiesen eine zunehmende DNA-Methylierung und abnehmende Expression auf, 25% der Gene wiesen hingegen einen DNA-Hypomethylierung und gleichzeitige Zunahme der Expression auf. Für weitere 12% der Gene konnte eine gleichzeitig zunehmende DNA-Methylierung und Expression nachgewiesen werden und 6% der Gene zeigten das umgekehrte Verhältnis einer gleichzeitig abnehmenden DNA-Methylierung und Genexpression. Die beiden zuletzt genannten Gruppen entsprechen nicht der Theorie einer negativen Regulation der Genexpression durch Promotermethylierung (Mohandas *et al.*, 1981; Hansen & Gartler, 1990). Eine wesentlich größere Anzahl an Genen, nämlich 988 Gene wiesen eine gleichzeitige Veränderung der DNA-Methylierung im Genkörper und in der Genexpression auf (Abbildung 13, B). An dieser Stelle konnte keine klare Korrelation zwischen der DNA-Modifikation und der Expressionsrate nachgewiesen werden, so wiesen 46% der Gene eine positive Korrelation und 54% eine negative Korrelation auf. Während 34% der Gene eine gleichzeitig abnehmende und 12% eine gleichzeitig zunehmende DNA-Methylierung und

Expression aufwiesen, konnte für 38% der Gene eine zunehmende DNA-Methylierung und abnehmende Expression, sowie für 16% der Gene eine abnehmende DNA-Methylierung und zunehmende Expression gezeigt werden.



**Abbildung 13: Korrelationsanalyse der DNA-Methylierung und der Genexpression während der HSZ-Aktivierung.** Alle Gene, die eine gleichzeitige Veränderung der DNA-Methylierung von mehr als 20% und eine mindestens zweifach veränderte Genexpression aufwiesen, wurden gegeneinander aufgetragen, um eine mögliche Korrelation der beiden Veränderungen nachzuweisen. Jedes dieser Gene wird in der Abbildung durch einen roten Punkt repräsentiert. **(A)** 51 Gene wiesen eine differentielle Promotermethylierung und Genexpression auf. Für 82% der Gene konnte eine negative Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Genexpression nachgewiesen werden. **(B)** 988 Gene zeigten gleichzeitig Veränderungen der Genkörpermethylierung und der Genexpression. Es konnte keine Korrelation zwischen diesen beiden Veränderungen nachgewiesen werden. Die Daten stammen aus dem Methyl-MiniSeq Array und dem Affymetrix Genexpressionsarray. Abbildung modifiziert aus Schumacher *et al.* (2017). (HSZ: Hepatische Sternzellen)

#### 4.6 Epigenetische Regulation spezifischer Gene während der HSZ-Aktivierung

Nach der globalen und genomweiten Betrachtung der DNA-Methylierung und Genexpression während der HSZ-Aktivierung folgte eine vertiefende Analyse von spezifischen Genen. Dazu wurden Gene ausgewählt, die in den *Arrays* Veränderungen sowohl in der DNA-Methylierung als auch in der Expression aufwiesen. Die in den *Arrays* dokumentierten Veränderungen wurden mittels Bisulfit-Sequenzierung (BS-Seq) und qPCR verifiziert. Die Auswahl der Gene erfolgte anhand der Stärke der

Veränderungen und bereits bekannter biologischer Funktionen, die in Hinblick auf die HSZ-Aktivierung eine interessante Rolle spielen könnten. In den Kapiteln 4.6.1 und 4.6.2 wird zunächst die vertiefende Analyse der Gene Deltex 4 (Dtx4) und Wilms tumor protein homolog 1 (Wt1) besprochen werden. In Kapitel 4.6.3 folgen dann weitere Gene mit differentieller Promotermethylierung, in Kapitel 4.6.4 werden weitere Gene mit differentieller DNA-Methylierung im Genkörper vorgestellt.

#### 4.6.1 Dtx4 während der HSZ-Aktivierung

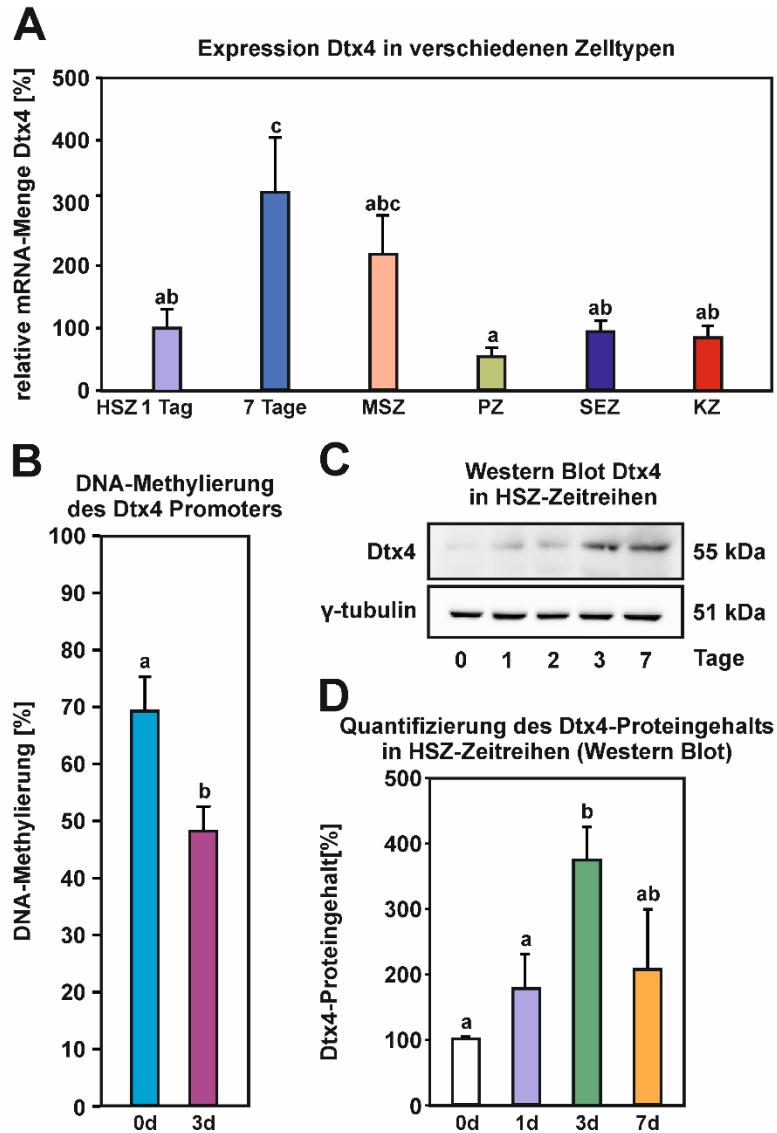
Das Gen für den Notch-Regulator Dtx4 erfuhr während der HSZ-Aktivierung sowohl eine veränderte DNA-Methylierung im Bereich des Promoters, als auch eine Veränderung der Genexpression. Die im *Array* angegebene Abnahme der Promotermethylierung von 21% konnte über BS-Seq bestätigt werden (Tabelle 14, Abbildung 14, B).

Ebenso konnte in der qPCR ein mehr als dreifacher Anstieg der mRNA-Menge für Dtx4 im Verlauf der HSZ-Aktivierung detektiert werden (Abbildung 14, A), dieser Anstieg der Dtx4-Expression war auch schon aus den Genexpressionsarrays ersichtlich (Tabelle 14). Da Dtx4 als ein Regulator des Notch-Signalwegs beschrieben wird und dieser Signalweg eine wichtige Rolle in Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen spielt, erfolgte eine tiefergehende Analyse. Zunächst wurde die Expression von Dtx4 in aktivierten HSZ mit der Expression des Gens in weiteren Zelltypen der Leber verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass weder Parenchymzellen, noch Sinusendothel- oder Kupfferzellen eine derart starke Dtx4-Expression aufwiesen wie aktivierte HSZ. Interessanterweise wiesen MSZ aus dem Knochenmark der Ratte ebenfalls eine erhöhte Dtx4-Expression auf. Im Anschluss wurde anhand von Western Blot Experimenten untersucht, ob sich die steigende Dtx4-Genexpression im Verlauf der HSZ-Aktivierung auch in einem erhöhten Dtx4-Proteingehalt widerspiegelt. Der Nachweis von Dtx4 mittels spezifischem Antikörper zeigte deutlich den gestiegenen Gehalt an Dtx4 in aktivierten HSZ im Vergleich zu den ruhenden Zellen (Abbildung 14, C). Eine Quantifizierung der Signale im Western Blot aus drei unabhängigen Experimenten ergab, dass der höchste Gehalt an Dtx4-Protein am dritten Tag der HSZ-Aktivierung vorlag (Abbildung 14, D).

#### 4.6.2 Wt1 während der HSZ-Aktivierung

Wt1 wies im Verlauf der HSZ-Aktivierung eine Zunahme der DNA-Methylierung im intronischen Bereich des Gens auf, im DNA-Methylierungsarray konnte eine Zunahme um 28%, in der BS-Seq eine Zunahme um 23% gezeigt werden (Tabelle 14, Abbildung 15, B). Neben der ansteigenden intergenen Methylierung erfolgte begleitend eine verstärkte Expression des Wt1-Gens, diese wurde sowohl in den Expressionsarrays als auch anhand von qPCR-Analysen gezeigt. Die Quantifizierung der mRNA-Menge ergab eine mehr als 8-fache Zunahme der Wt1-Expression während der HSZ-Aktivierung (Tabelle 14, Abbildung 15, A). Da Wt1 in Mesothelzellen exprimiert wird, aus denen HSZ im Rahmen der Embryogenese hervorgehen sollen (Asahina *et al.*, 2011), erfolgte auch für dieses Gen eine vertiefende

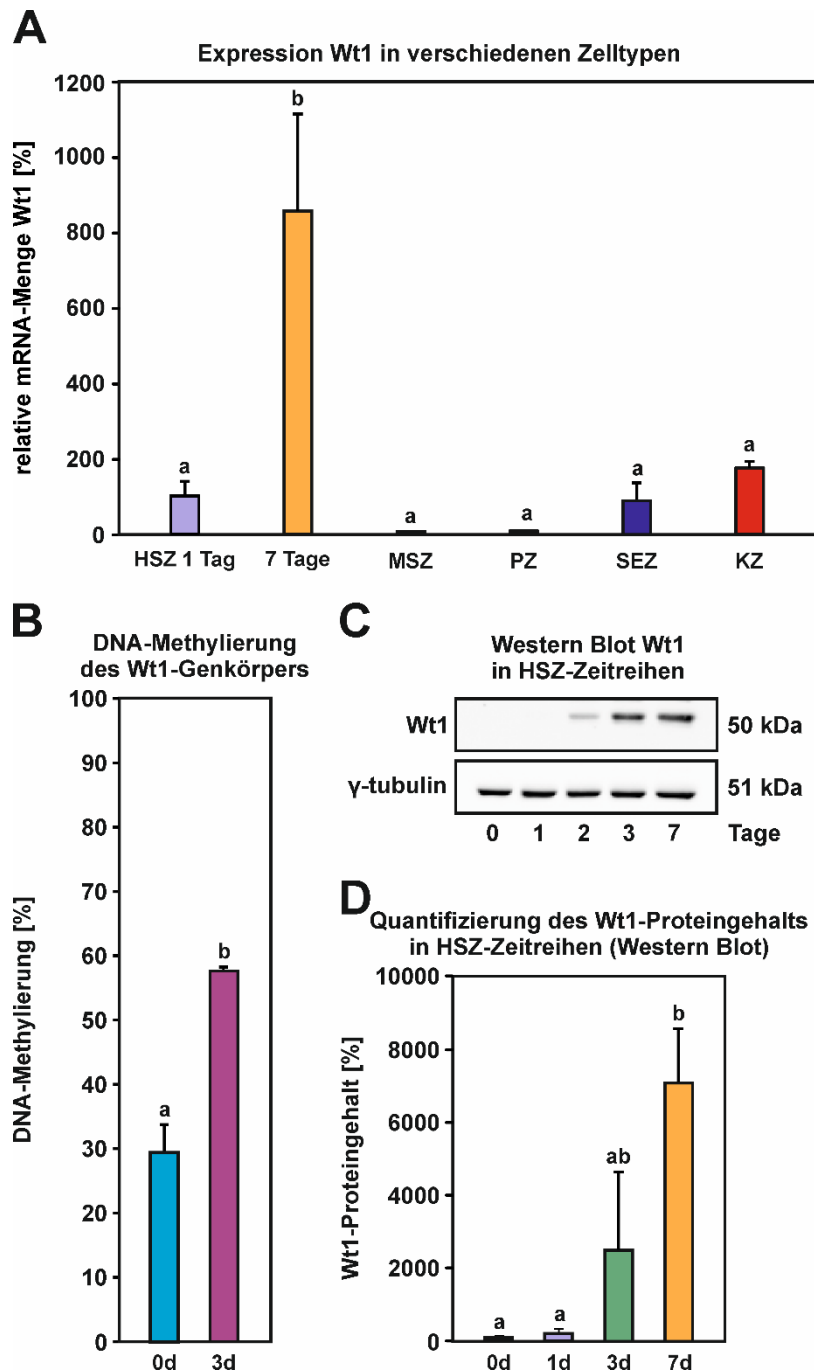




**Abbildung 14: Epigenetische Regulation der Dtx4-Expression.** (A) Die Genexpression von Dtx4 wurde in HSZ an Tag 1 und 7 der Kultur, sowie in mesenchymalen Stammzellen und diversen Zelltypen der Leber bestimmt. Aktivierte HSZ an Tag 7 wiesen eine signifikant erhöhte Dtx4-Expression im Vergleich zu ruhenden HSZ und anderen Zelltypen der Leber auf. MSZ wiesen interessanterweise ebenfalls eine erhöhte Dtx4-Expression auf. (n=3-4) (B) Das Ergebnis des DNA-Methylierungsarrays konnte über Bisulfit-Sequenzierung bestätigt werden. Die DNA-Methylierung im Promoter von Dtx4 nahm von Tag 0 zu Tag 3 signifikant ab (n=3). (C) Der Proteingehalt an Dtx4 wurde in Kultur-induzierten HSZ in Western Blot Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg an Dtx4-Protein in aktivierten gegenüber ruhenden HSZ. (D) Die Signale dreier unabhängiger Western Blot Experimente wurden densitometrisch ausgewertet (n=3). Die statistische Auswertung erfolgte über den T-Test nach Student und Varianzanalyse (ANOVA). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der erhobenen Daten + SEM. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt, gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen bedeuten, dass diese Messwerte keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Abbildung modifiziert aus Schumacher *et al.* (2017). (Dtx4: Deltex4, HSZ: Hepatische Sternzellen, KZ: Kupferzellen MSZ: mesenchymale Stammzellen, PZ: Parenchymzellen, SEM: *standard error of the mean*, SEZ: Sinusendothelzellen)

Analyse. Im Vergleich mit Parenchym-, Sinusendothel- und Kupferzellen wurde gezeigt, dass in der Leber lediglich aktivierte HSZ eine erhöhte Wt1-Expression aufwiesen. Die Expression in Sinusendothel- und Kupferzellen lag dabei auf dem Level der ruhenden Sternzellen, Parenchymzellen

exprimierten Wt1 im Vergleich dazu nur in sehr geringem Maße. Dies galt auch für die ebenfalls analysierten MSZ aus dem Knochenmark der Ratte (Abbildung 15, A).



**Abbildung 15: Epigenetische Regulation der Wt1-Expression.** (A) Die Genexpression von Wt1 wurde in HSZ an Tag 1 und 7 der Kultur, sowie in mesenchymalen Stammzellen und diversen Zelltypen der Leber bestimmt. Aktivierte HSZ an Tag 7 wiesen eine signifikant erhöhte Wt1-Expression im Vergleich zu ruhenden HSZ, anderen Zelltypen der Leber und MSZ auf. (n=3-4) (B) Das Ergebnis des DNA-Methylierungsarrays konnte über Bisulfid-Sequenzierung bestätigt werden. Die DNA-Methylierung im Genkörper von Wt1 stieg von Tag 0 zu Tag 3 signifikant an (n=3). (C) Der Proteingehalt an Wt1 wurde in Kultur-induzierten HSZ in Western Blot Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dabei zeigte sich ein deutlicher Anstieg an Wt1-Protein in aktivierten gegenüber ruhenden HSZ. (D) Die Signale dreier unabhängiger Western Blot Experimente wurden densitometrisch ausgewertet (n=3). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der erhobenen Daten + SEM. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen bedeuten, dass diese Messwerte keinen signifikanten Unterschied aufwiesen. Abbildung modifiziert aus Schumacher *et al.* (2017). (HSZ: Hepatische Sternzellen, KZ: Kupferzellen MSZ: mesenchymale Stammzellen, PZ: Parenchymzellen, SEM: *standard error of the mean*, SEZ: Sinusendothelzellen, Wt1: *Wilms tumor protein homolog 1*.)

Die im Anschluss durchgeführten Western Blot Analysen zeigten einen deutlichen Anstieg des Wt1-Proteingehalts im Verlauf der HSZ-Aktivierung. Während an Tag 0 und Tag 1 ein nur sehr geringes Signal für Wt1 detektiert werden konnte, zeigte sich an Tag 2 der Kultur eine leichte und an den Tagen 3 und 7 eine deutliche Zunahme an Wt1-Protein (Abbildung 15, C, D).

#### 4.6.3 Gene mit differentieller Promotermethylierung

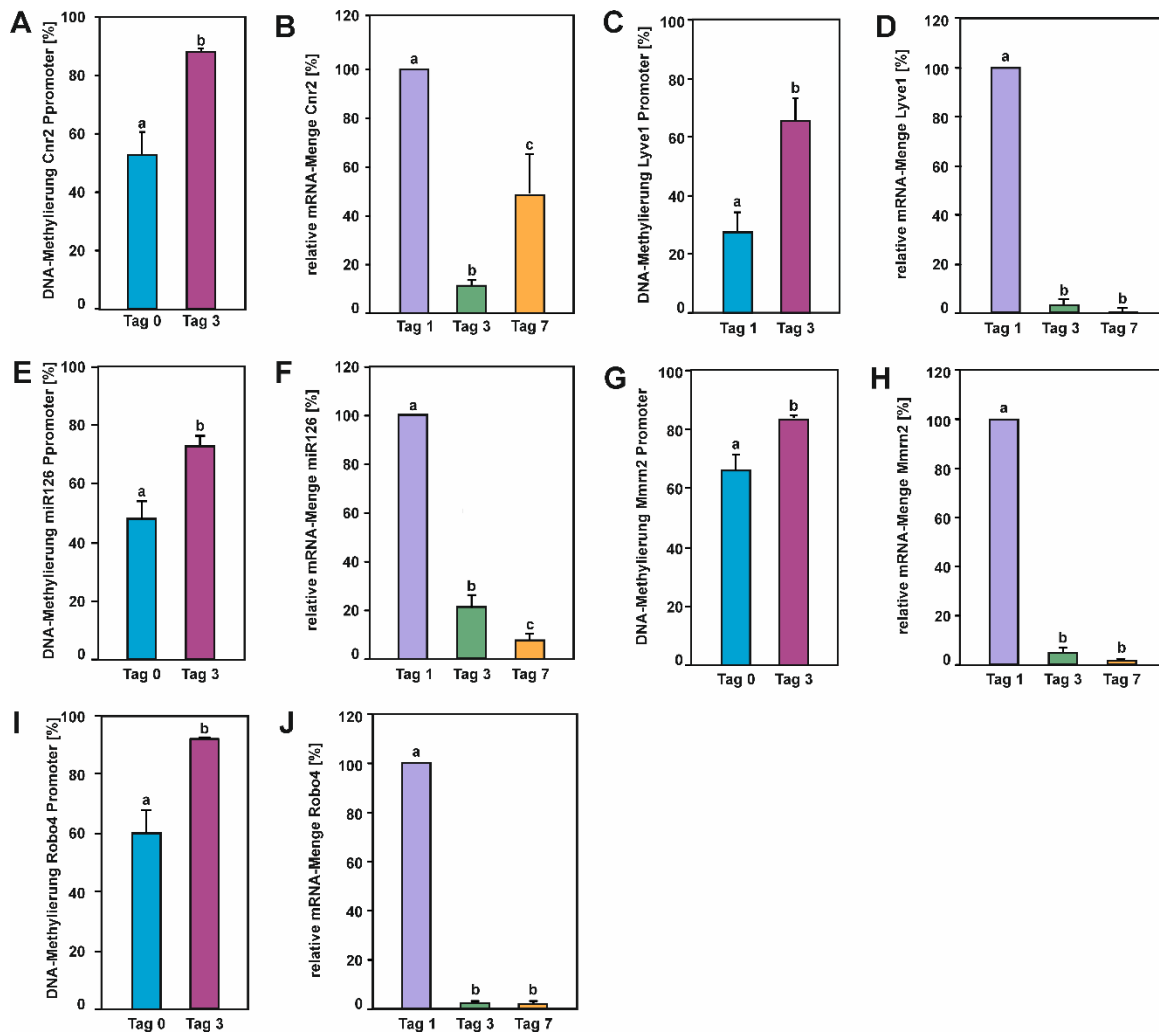
Zu den Genen mit differentieller Promotermethylierung gehörte unter anderen der Cannabinoidrezeptor 2 (Cnr2). Während die DNA-Methylierung im Promoter von Cnr2 zwischen Tag 0 und 3 der HSZ-Aktivierung um 35% anstieg (Abbildung 16, A), ging die Genexpression bis Tag 3 temporär auf 10% der Expression in ruhenden HSZ zurück (Abbildung 16, B). Bis Tag 7 stieg die Expression wieder auf ca. 50% des Ausgangswertes an Tag 1 an. Im DNA-Methylierungsarray wurde im Cnr2-Promoter an zwei Stellen eine differentielle DNA-Methylierung angegeben, diese wies an einer Stelle einen Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 3 von 63%, in einem weiteren Bereich von 25% auf (Tabelle 14). Außerdem war die temporäre Abnahme der Cnr2-Expression an Tag 3 der HSZ-Aktivierung auch im Genexpressionsarray sichtbar (Tabelle 14). Die Ergebnisse für DNA-Methylierung und Genexpression aus den Arrays konnten also mittels BS-Seq und qPCR bestätigt werden.

Der Promoter des Hyaluronsäurerezeptors Lyve1 erfuhr während der frühen HSZ-Aktivierung eine zunehmende DNA-Methylierung um 34% (Abbildung 16, C), im Array war eine Hypermethylierung von 26% angegeben worden (Tabelle 14). Die aus den Genexpressionsarrays ersichtliche starke Reduktion der Lyve1-Expression während der HSZ-Aktivierung konnte durch die qPCR bestätigt werden, von Tag 1 der Kultur bis zum letzten Messzeitpunkt an Tag 7 zeigte sich ein Rückgang auf fast 0% des Ausgangswertes (Tabelle 14, Abbildung 16, D).

Von der epigenetischen Regulation waren nicht nur proteinkodierende Gene, sondern auch Genombereiche betroffen, die für miRNAs kodieren. Dazu gehörte die Vorläufersequenz der miRNA126, deren Promoter im Untersuchungszeitraum eine Zunahme der DNA-Methylierung um 25% aufwies (Abbildung 16, E). Damit konnte zwar die Tendenz aus dem Array bestätigt werden, allerdings wurde im Array eine stärkere Hypermethylierung von 36% angegeben (Tabelle 14). Gleichzeitig mit der zunehmenden Promotermethylierung sank die Expression der miRNA126 im Verlauf der HSZ-Aktivierung auf weniger als 10% des Ausgangswerts (Abbildung 16, F). Diese starke Abnahme der mRNA-Menge war auch aus den Ergebnissen der Genexpressionsarrays ersichtlich (Tabelle 14).

Auch das Gen Multimerin 2 (Mmrn2) erfuhr eine zunehmende Promotermethylierung und gleichzeitig eine abnehmende Expression. In der BS-Seq zeigte sich eine Zunahme der DNA-Methylierung um 18% (Abbildung 16, G), obwohl der DNA-Methylierungsarray eine stärkere Hypermethylierung von 50%

aufzeigte (Tabelle 14). Die qPCR-Untersuchungen ergaben eine Abnahme der mRNA-Menge auf fast 0% des Ausgangswertes (Abbildung 16, H), auch in den entsprechenden *Arrays* war eine starke Abnahme der *Mmrn2*-Expression zu sehen (Tabelle 14).



**Abbildung 16: Differenzielle DNA-Methylierung im Promoter und differentielle Genexpression von ausgewählten Genen während der HSZ-Aktivierung.** In ausgewählten Genen wurden die Ergebnisse aus dem DNA-Methylierungsarray sowie aus den Genexpressionsarrays mittels Bisulfit-Sequenzierung und quantitativer PCR bestätigt. Die DNA-Methylierung wurde in frisch isolierten und bis Tag 3 kultivierten HSZ in Relation zueinander bestimmt. Die mRNA-Menge der untersuchten Gene wurde an den Tagen 1, 3 und 7 der HSZ-Aktivierung bestimmt und relativ zum Wert an Tag 1 dargestellt. Zu den Genen die im Rahmen der HSZ-Aktivierung eine negative Korrelation zwischen Promotermethylierung und Genexpression aufwiesen gehörten **(A+B)** *Cnr2*, **(C+D)** *Lyve1*, **(E+F)** *microRNA126*, **(G+H)** *Mmrn2* und **(I+J)** *Robo4*. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen entsprechen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Varianz ist als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben (Bisulfitsequenzierung:  $n=3$ , Expressionsanalysen:  $n=3-5$ ). Daten publiziert in Götze *et al.* (2015) und Schumacher *et al.* (2017). (*Cnr2*: Cannabinoidrezeptor 2, HSZ: Hepatische Sternzellen, *Lyve1*: *lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1*, miRNA: microRNA, *Mmrn2*: Multimerin 2, *Robo4*: Roundabout 4)

Der Promoter des Gens *roundabout 4 homolog* (Robo4) wies eine zunehmende DNA-Methylierung um 33% bei Durchführung der BS-Seq (Abbildung 16, I) bzw. 41% im DNA-Methylierungsarray (Tabelle 14) auf. Gleichzeitig zeigte sich auf mRNA-Ebene sowohl in der qPCR als auch in den Expressionsarrays eine Abnahme der Robo4-Expression (Abbildung 16, J, Tabelle 14). Die Quantifizierung der mRNA-Menge mittels qPCR ergab zwischen Tag 1 und 7 einen Rückgang der mRNA-Menge auf fast 0% des Ausgangswertes.

**Tabelle 14: Zusammenfassung der DNA-Methylierungs- und Genexpressionsänderungen für ausgewählte Gene mit differentieller Promoter- oder Genkörpermethylierung.** Angegeben ist jeweils der Name des Gens, die ermittelten Veränderungen der DNA-Methylierung in HSZ zwischen Tag 0 und 3 bestimmt über den Methyl MiniSeq DNA-Methylierungsarray und über Bisulfit-Sequenzierung (BS-Seq) sowie die Tendenz der differentiellen Genexpression während der ersten Tage der HSZ-Aktivierung, die im Gen-Expressionsarray von Affymetrix und quantitativ in der qPCR ermittelt wurde. (HSZ: Hepatische Sternzellen)

Gen	DNA-Methylierung		Genexpression	
	Methyl MiniSeq	BS-Seq	Expressionsarray	qPCR
<b>Gene mit differentieller Promotermethylierung</b>				
<b>Cnr2</b>	63%	33%	Abnahme	Abnahme
<b>Dtx4</b>	-21%	-21%	Anstieg	Anstieg
<b>Lyve1</b>	26%	34%	Abnahme	Abnahme
<b>miR126</b>	36%	25%	Abnahme	Abnahme
<b>Mmrn2</b>	50%	18%	Abnahme	Abnahme
<b>Robo4</b>	41%	33%	Abnahme	Abnahme
<b>Gene mit differentieller intergener DNA-Methylierung</b>				
<b>APC2</b>	34 %	18%	Anstieg	Anstieg
<b>Bmp4</b>	22%	20%	Anstieg	Anstieg
<b>Cxxc5</b>	30%	7%	Anstieg	Anstieg
<b>Klf2</b>	52%	34%	Abnahme	Abnahme
<b>Lhx6</b>	-23%, -36%	-28%	Abnahme	Abnahme
<b>Sparcl1</b>	-40%	-23%	Abnahme	Abnahme
<b>Sulf2</b>	48%, 33%	30%	Anstieg	Anstieg
<b>Wnt5a</b>	26%	20%	Anstieg	Anstieg
<b>Wt1</b>	28%	23%	Anstieg	Anstieg

#### 4.6.4 Gene mit differentieller Genkörpermethylierung

Zusätzlich zu den ausgewählten Genen mit differentieller Promotermethylierung wurden auch Gene untersucht, die eine differentielle DNA-Methylierung im Genkörper aufwiesen. Das am Wnt-Signalweg beteiligte Gen *adenomatous polyposis coli protein 2* (Apc2) wies eine zunehmende DNA-Methylierung im sechsten Exon des Gens auf. Die hier auftretende Hypermethylierung betrug laut DNA-Methylierungsarray 34%, eine Hypermethylierung von 18% konnte über Bisulfitsequenzierung bestätigt werden (Abbildung 17, A, Tabelle 14). Gleichzeitig mit der zunehmenden intergenen DNA-Methylierung konnte sowohl in den Expressionsarrays als auch in der qPCR eine zunehmende

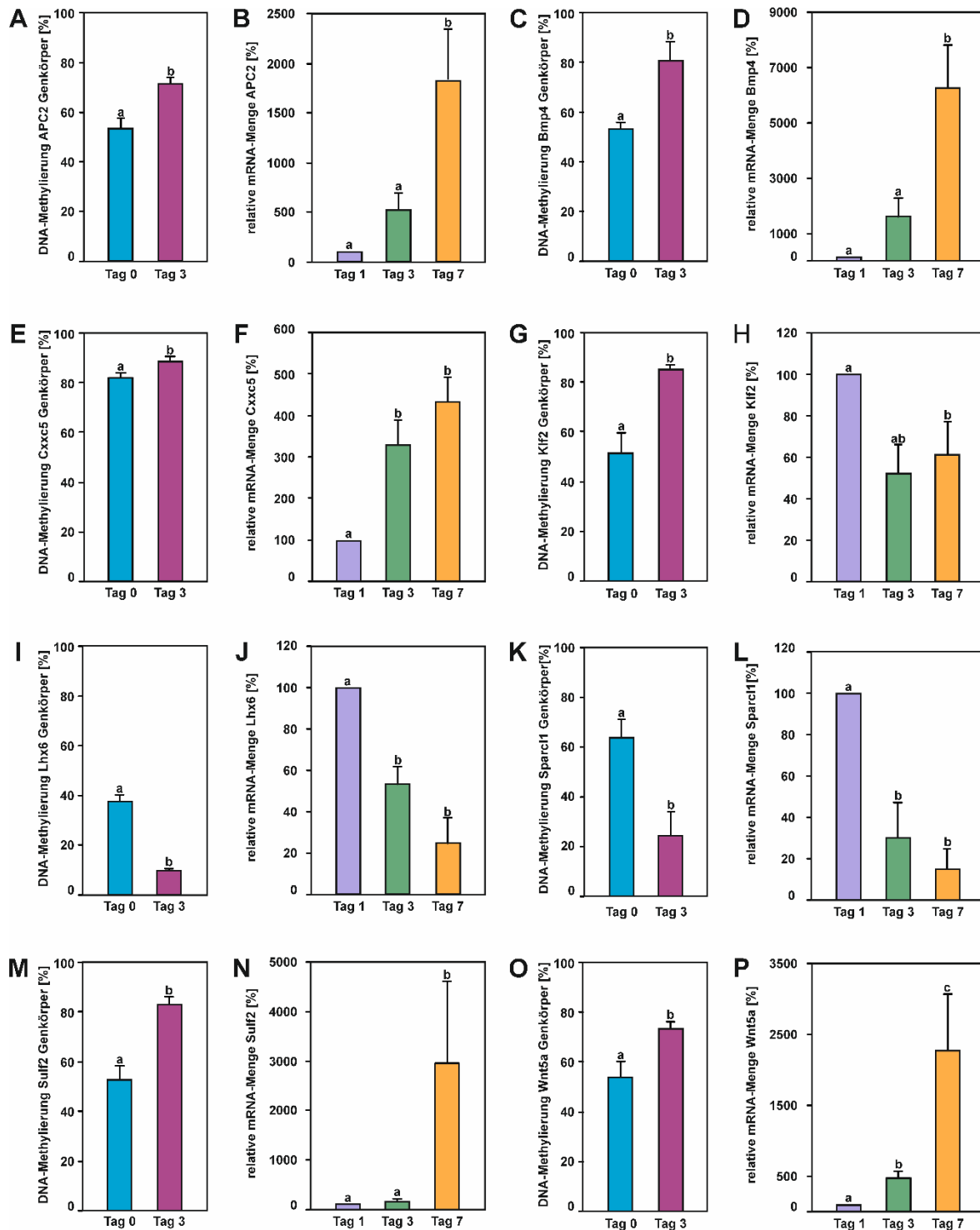
Genexpression festgestellt werden. Die Quantifizierung wies eine Zunahme der mRNA-Menge bis Tag 7 um mehr als das 10-fache des Ausgangswerts an Tag 1 nach (Tabelle 14, Abbildung 17, B).

Das Gen *Bmp4* wies sowohl in den *Arrays* als auch im Rahmen der BS-Sequenzierung eine vergleichsweise geringe Zunahme der DNA-Methylierung von knapp 20% im Intronbereich auf (Tabelle 14, Abbildung 17, C). Auch für dieses Gen zeigte sich parallel zur Veränderung der DNA-Methylierung eine sehr starke Zunahme der mRNA-Menge. Diese Tendenz aus den Daten der *Expressionsarrays* konnte in der qPCR quantitativ bestätigt werden. Bis zum Tag 7 der HSZ-Aktivierung stieg die *Bmp4*-Expression auf über das 60-fache des Ausgangswerts (Tabelle 14, Abbildung 17, D).

Obwohl die im *Array* nachgewiesene DNA-Hypermethylierung von 30% im zweiten Exon des *CXXC-type zinc finger protein 5* (*Cxxc5*)-Gens in der BS-Sequenzierung nicht bestätigt werden konnte (hier ergab sich nur ein Unterschied von 7%) (Abbildung 17, E, Tabelle 14) zeigte sich sowohl in den *Arrays*, als auch in den qPCR-Analysen eine Zunahme in der Genexpression von *Cxxc5* (Tabelle 14, Abbildung 17, F). In der qPCR ließ sich eine stetige Zunahme der mRNA-Menge bis Tag 7 auf über das 4-fache des Ausgangswertes feststellen.

Bei der Auswertung der *Arrays* ergab sich für *Krüppel-like factor 2* (*Klf2*) eine Zunahme der DNA-Methylierung im dritten und letzten Exon und darüber hinaus in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) um 52% sowie eine Abnahme der Genexpression (Tabelle 14). Beide Ergebnisse konnten bestätigt werden, in der BS-Sequenzierung ergab sich eine Zunahme der DNA-Methylierung um 34% (Abbildung 17, G) und in der qPCR eine Abnahme der *Klf2*-mRNA-Menge auf etwa 50% des Ausgangswertes bis Tag 3 (Abbildung 17, H). Danach war bis zum Tag 7 der Kultur wieder eine langsame Zunahme der mRNA-Menge zu beobachten.

Das *LIM/homeobox protein 6* (*Lhx6*) wies laut DNA-Methylierungsarray an mehreren Stellen im Intron- und Exonbereich eine abnehmende Methylierung zwischen 23% und 36% auf, in der BS-Sequenzierung konnte eine Hypomethylierung von 28% bestätigt werden (Tabelle 14, Abbildung 17, I). Obwohl der *Expressionsarray* keine nennenswerte Veränderung der *Lhx6*-Expression anzeigte, konnte mittels qPCR gezeigt werden, dass die Expression auf 25% des Ausgangswerts an Tag 1 zurückgeht (Tabelle 14, Abbildung 17, J).



**Abbildung 17: Differentielle DNA-Methylierung im Genkörper und differentielle Genexpression von ausgewählten Genen während der HSZ-Aktivierung.** In ausgewählten Genen wurden die Ergebnisse aus dem DNA-Methylierungsarray, sowie aus dem Genexpressionsarray mittels BS-Sequenzierung und qPCR bestätigt. Die DNA-Methylierung wurde in frisch isolierten und bis Tag 3 kultivierten HSZ in Relation zueinander bestimmt. Die mRNA-Menge wurde an den Tagen 1, 3 und 7 der HSZ-Aktivierung bestimmt und relativ zum Wert an Tag 1 dargestellt. Die untersuchten Gene umfassten (A+B) APC2, (C+D) Bmp4, (E+F) Cxxc5, (G+H) Klf2, (I+J) Lhx6, (K+L) Sparcl1, (M+N) Sulf2 und (O+P) Wnt5a. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen entsprechen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Varianz ist als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben (Bisulfidsequenzierung:  $n=3$ , Expressionsanalysen:  $n=3-5$ ). Daten publiziert in Götze *et al.* (2015) und Schumacher *et al.* (2017). (APC2: adenomatous polyposis coli protein 2, Bmp4: bone morphogenetic protein 4, Cxxc5: CXXC-type zinc finger protein 5, HSZ: Hepatische Sternzellen, Klf2: Krueppel-like factor 2, Lhx6: LIM/homeobox protein 6, Sparcl1: Sparc-like protein 1, Sulf2: extracellular sulfatase 2)

Der Marker ruhender HSZ, *SPARC-like protein 1* (*Sparcl1*) wies während der HSZ-Aktivierung sowohl im *Array* als auch in den BS-Sequenzierungen eine abnehmende Methylierung im Intronbereich auf. Diese DNA-Hypomethylierung war in der BS-Seq mit 40% höher als im *Array*, dort lag sie bei 23% (Tabelle 14, Abbildung 17, K). Gleichzeitig mit der abnehmenden DNA-Methylierung im Genkörper trat ein deutlicher Rückgang der Genexpression ein, der in den *Arrays* und in der qPCR zu beobachten war (Tabelle 14). In der qPCR ergab sich in den ersten 7 Tagen der HSZ-Aktivierung ein Rückgang der *Sparcl1*-Expression um 85% (Abbildung 17, L).

Die Sulfatase 2 (*Sulf2*) wies eine zunehmende Methylierung im letzten Exon des Gens von 48%, sowie im Intronbereich von 33% auf. Eine Hypermethylierung von 30% konnte über BS-Sequenzierung bestätigt werden (Abbildung 17, M). Die gleichzeitige Zunahme der Expression von *Sulf2*, die im *Expressionsarray* ersichtlich war, konnte auch in der qPCR-Analyse gezeigt werden, bis zum Tag 7 ließ sich ein Anstieg auf das 30-fache des Ausgangswerts beobachten (Tabelle 14, Abbildung 17, N).

Auch *Wnt5a* wies während der HSZ-Aktivierung sowohl in intronischen als auch in exonischen Bereichen laut *Array* eine ansteigende DNA-Methylierung von 26% auf (Tabelle 14). In der BS-Sequenzierung ergab sich eine Zunahme der DNA-Methylierung um 20% (Abbildung 17, O). Die Expression von *Wnt5a* nahm laut der *Arrays* und der qPCR-Ergebnisse während der HSZ-Aktivierung stark zu, in der Quantifizierung ergab sich eine Zunahme um mehr als das 20-fache bis Tag 7 (Tabelle 14, Abbildung 17, P).

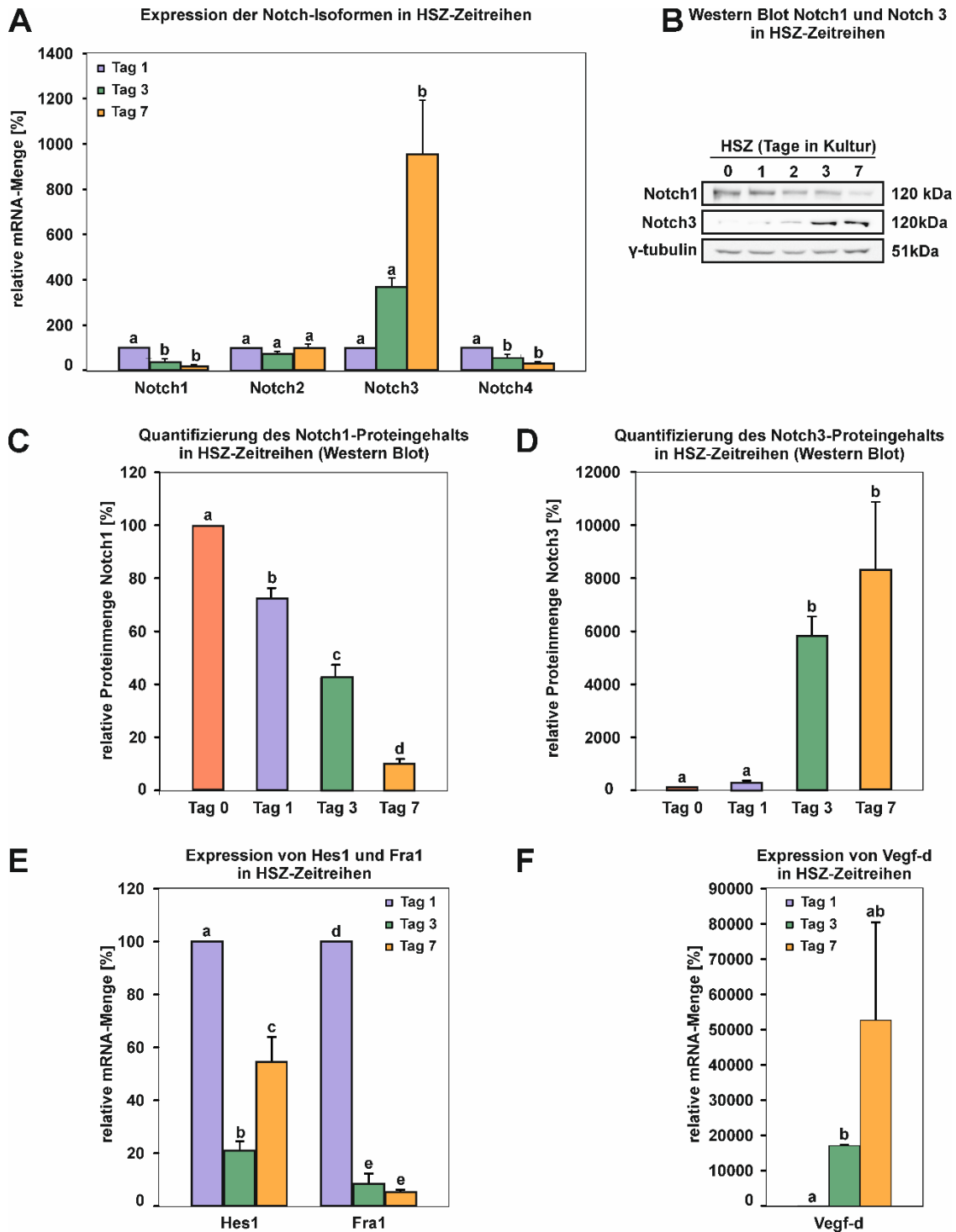
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Gene mit differentieller Methylierung in Introns oder Exons eine positive Korrelation der DNA-Methylierung mit der Genexpression aufwiesen.

#### 4.7 Der Notch-Signalweg während der HSZ-Aktivierung

Aufgrund der stark veränderten Genexpression von *Dtx4* (Abbildung 14), einem Regulator des Notch-Signalwegs, wurde im Folgenden die Expression der vier Notch-Rezeptoren während der HSZ-Aktivierung genauer untersucht.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass sich die Expression einzelner Notch-Rezeptoren während des Aktivierungsprozesses veränderte (Abbildung 18, A). Während *Notch1* und *Notch4* in den ersten 7 Tagen der HSZ-Kultur stark vermindert exprimiert wurden und *Notch2* keine signifikante Veränderung in der Genexpression aufwies, erfuhr *Notch3* eine verstärkte Expression bis zum Tag 7 auf das fast 10-fache des Wertes in ruhenden HSZ.





**Abbildung 18: Der Notch-Signalweg während der HSZ-Aktivierung.** Die HSZ wurden bis zu 7 Tage in Kultur aktiviert, im Anschluss wurde die Genexpression mittels quantitativer PCR und der Proteingehalt über Western Blot bestimmt. **(A)** Während Notch1 und Notch4 vermindert exprimiert wurden, wies Notch2 keine signifikante Veränderung und Notch3 eine starke Hochregulation der Genexpression in den qPCR-Analysen auf (n=5-6). **(B)** Nachweis des Proteingehalts an Notch1 und Notch3 in Kultur-induzierten HSZ. Notch3 wurde verstärkt, Notch1 vermindert auf Proteinebene nachgewiesen. **(C+D)** Densitometrisch ausgewertete Western Blot Analysen für Notch 1 **(C)** und Notch3 **(D)** (n=3). **(E+F)** Die Notch1-Zielgene Hes1 und Fra1 wiesen in der qPCR eine verminderte Expression auf, wohingegen die Expression von Vegf-d stark anstieg (n=3). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der erhobenen Daten + SEM. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen entsprechen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Abbildung modifiziert aus Schumacher et al. (2017). (Fra1: *fos-related antigen 1*, Hes1: *hairy and enhancer of split 1*, HSZ: Hepatische Sternzellen, Vegf: *vascular endothelial growth factor*)

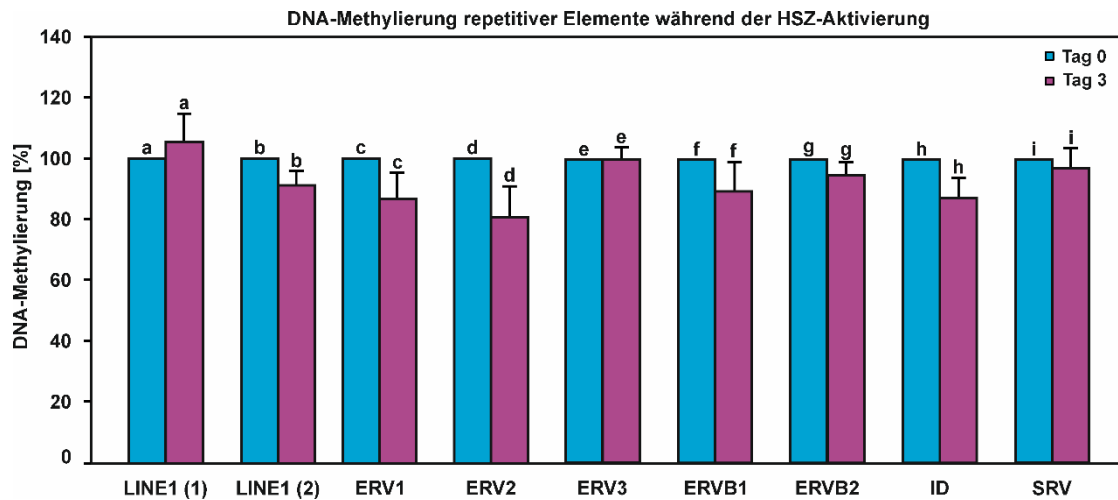
Die veränderte Expression führte im Fall von Notch1 auch auf Proteinebene zu einem verminderten Gehalt des 120 kDa schweren membranständigen Rezeptors (Abbildung 18 B, C).

Der Rezeptor Notch3 wurde hingegen im Verlauf der HSZ-Aktivierung verstärkt im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 18, B, D). Einen weiteren Hinweis auf eine Veränderung in der Notch-Signalgebung lieferte die Quantifizierung der mRNA von Notch-Zielgenen. Während die Transkriptionsfaktoren *hairy and enhancer of split 1* (Hes1) und *fos-related antigen 1* (Fra1), deren Expression durch Notch1 positiv (Jarriault *et al.*, 1998; Talora *et al.*, 2002) und Notch3 negativ (Gu *et al.*, 2016) beeinflusst wird, im Verlauf der HSZ-Aktivierung vermindert exprimiert wurden (Abbildung 18, E), zeigte der Wachstumsfaktor *vascular endothelial growth factor d* (Vegf-d) eine verstärkte Expression (Abbildung 18, F). Die Expression von Vegf-d wird durch den Transkriptionsfaktor cFos induziert, welcher negativ durch Notch1 reguliert wird (Wang *et al.*, 2007; Talora *et al.*, 2002). In den Genexpressionsarrays ergab sich während der HSZ-Aktivierung eine verminderte Expression von cFos.

#### 4.8 DNA-Methylierung repetitiver Elemente während der HSZ-Aktivierung

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass während der HSZ-Aktivierung starke Veränderungen sowohl auf der Ebene der DNA-Methylierung, als auch der Genexpression auftraten. Dabei wurde nachgewiesen, dass differentiell methylierte Regionen, die im Kontext mit einem kodierenden Gen auftraten, vorrangig eine zunehmende DNA-Methylierung aufwiesen, obwohl global eine sehr starke DNA-Demethylierung beobachtet wurde. In einem weiteren Versuch sollte daher geklärt werden, an welcher Stelle im Genom, wenn nicht im kodierenden Bereich, diese starke Abnahme der DNA-Methylierung stattfand. Repetitive Sequenzen, die etwa 40% des Rattengenoms ausmachen, sind Bereiche mit einem hohen Grad an DNA-Methylierung (Yoder *et al.*, 1997). Mithilfe dieser Modifikation wird die genomische Stabilität gewährleistet, so wird z.B. die Transkription und Reintegration transposabler Elemente verhindert (Yoder *et al.*, 1997). Mittels der Konsensussequenzen für verschiedene repetitive Elemente wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die starke DNA-Demethylierung in diesen repetitiven Elementen erfolgte. An dieser Stelle wurde die DNA-Methylierung nicht über Bisulfitsequenzierung, sondern mittels qAMP ermittelt (siehe Kapitel 3.2.4). Über diese Methode konnten keine signifikanten Veränderungen der DNA-Methylierung in verschiedenen repetitiven Sequenzen nachgewiesen werden (Abbildung 19). Das *long interspersed nuclear element* LINE1 ist das am häufigsten auftretende repetitive Element im Säuger genom. Da es sich dabei um eine im Vergleich relativ lange Sequenz handelt, wurden zwei Bereiche der Sequenz ausgewählt und auf ihre DNA-Methylierung hin untersucht. In einem Bereich wurde eine leichte Abnahme, in dem anderen eine leichte Zunahme detektiert, diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant. Gleiches gilt für die endogenen Retroviren (ERV), aus dieser Gruppe wurden sechs verschiedene Sequenzen, ERV1-3 und ERVB1-2 sowie das *simian retrovirus* (SRV)

untersucht. Mit Ausnahme der Konsensussequenz für ERV3, in der keine Veränderung in der DNA-Methylierung festzustellen war, konnte für alle Elemente eine leichte, aber nicht signifikante Abnahme der DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Gleiches gilt auch für eine Konsensussequenz für *identifizier*-(ID)-Elemente. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die starke DNA-Demethylierung, die während der HSZ-Aktivierung auftrat, nicht auf Veränderungen der DNA-Methylierung in den untersuchten repetitiven Elementen zurückzuführen war.

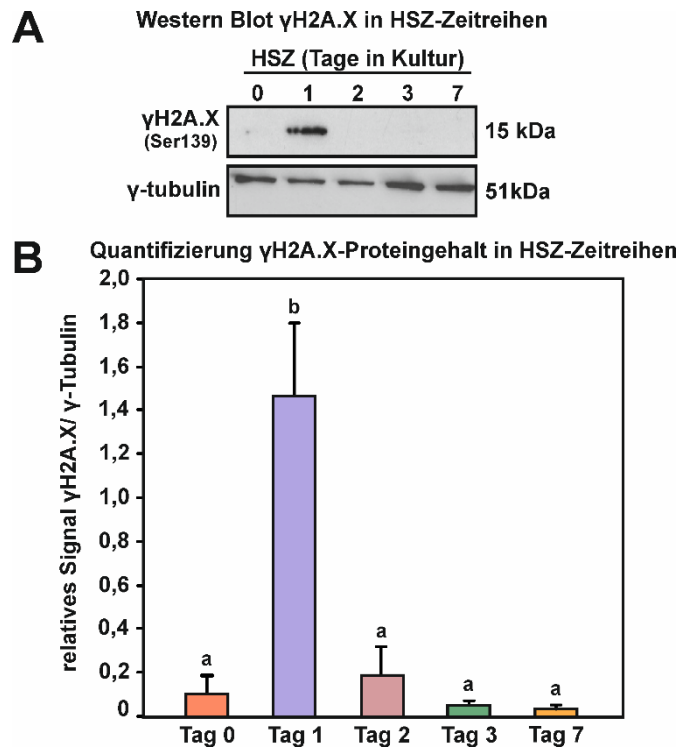


**Abbildung 19: DNA-Methylierung verschiedener repetitiver Elemente während der HSZ-Aktivierung.** Die Konsensussequenzen verschiedener repetitiver Elemente wurden mittels methylierungssensitiver Restriktionsenzyme auf Veränderungen in der DNA-Methylierung zwischen den Tagen 0 und 3 der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung untersucht. Alle untersuchten Elemente zeigten keine signifikanten Veränderungen der DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierung wurde in sechs unabhängigen HSZ-Isolationen untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen entsprechen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Varianz ist als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=6$ ). Abbildung modifiziert aus Götze *et al.* (2015). (ERV: endogener Retrovirus, HSZ: Hepatische Sternzellen, ID: *identifizier*, LINE: *long interspersed nuclear element*, SRV: *simian retrovirus*)

#### 4.9 Mechanismus der aktiven DNA-Demethylierung in HSZ

Inhibitorexperimente mit L-Mimosin zeigten, dass die starke DNA-Demethylierung, die während der HSZ-Aktivierung zu beobachten war, auf einem aktiven Mechanismus beruhte (siehe Kapitel 4.1). Einen weiteren Hinweis darauf, dass ein aktiver DNA-Demethylierungsmechanismus für die starke DNA-Demethylierung während der HSZ-Aktivierung verantwortlich war, lieferte die Untersuchung des  $\gamma$ -H2A.X-Gehalts. H2A.X ist eine Variante des Histons H2, einem Bestandteil des Histonkomplexes, der an der Organisation des Chromatins im Zellkern beteiligt ist (West & Bonner, 1980). Wenn Doppelstrangbrüche in der DNA auftreten, erfolgt eine Phosphorylierung des H2A.X an Serin 139, das modifizierte Histon wird auch als  $\gamma$ -H2A.X bezeichnet (Rogakou *et al.*, 1998). Die Modifikation dient der Rekrutierung von Enzymen der DNA-Reparatur, wie beispielsweise Nibrin (Nsb1) (Kobayashi *et al.*, 2002) und des *mediator of DNA damage checkpoint protein 1* (Mdc1) (Stewart *et al.*, 2003). Um eine

Aussage über das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen während der HSZ-Aktivierung treffen zu können, wurde die Menge an  $\gamma$ -H2A.X mittels Western Blot bestimmt. Es zeigte sich, dass  $\gamma$ -H2A.X während der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung nur sehr kurzzeitig an Tag 1 nachweisbar war (Abbildung 20, A, B). An Tag 1 der HSZ-Aktivierung traten DNA-Doppelstrangbrüche also vermehrt auf.



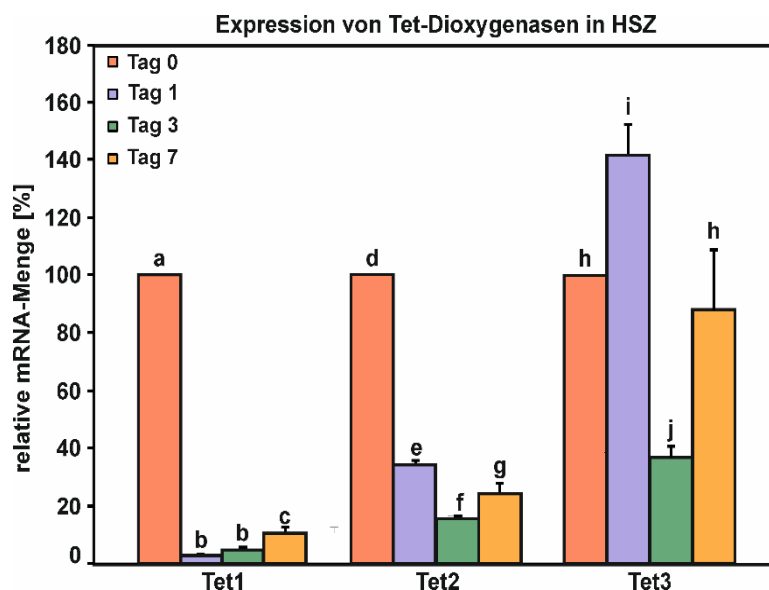
**Abbildung 20:  $\gamma$ -H2A.X-Gehalt in aktivierenden HSZ.** In Kultur-induzierten HSZ wurde mittels Western Blot das Auftreten der Histonmodifikation  $\gamma$ -H2A.X bestimmt. An Tag 1 konnte im Gegensatz zu den anderen Zeitpunkten ein verstärktes Auftreten der Modifikation nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen entsprechen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Varianz ist als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=3$ ). (HSZ: Hepatische Sternzellen)

Die aktive DNA-Demethylierung ist noch nicht zufriedenstellend aufgeklärt und scheint, abhängig von Zelltyp und Entwicklungsstadium, unterschiedliche Enzyme und Reaktionswege zu beinhalten (siehe Abschnitt 1.4.4). Um einen möglichen Mechanismus der aktiven DNA-Demethylierung während der HSZ-Aktivierung identifizieren zu können, wurde sowohl die Expression als auch der Proteingehalt verschiedener potentiell an der aktiven DNA-Demethylierung beteiligter Proteine untersucht. Dazu wurde die mRNA-Menge mittels qPCR und der Proteingehalt über Western Blot Analysen bestimmt. Obwohl in Abschnitt 4.4.2 dieser Arbeit darauf hingewiesen wurde, dass die Haushaltsgene an Tag 0 der HSZ-Aktivierung differentiell exprimiert werden und dieser Zeitpunkt daher nicht zur Auswertung hinzugezogen wurde, wurde er an dieser Stelle trotzdem für die Analysen verwendet und in den folgenden Abbildungen dargestellt. Ein Grund dafür ist, dass der Aktivierungsprozess sehr zeitnah nach der Isolation der HSZ begann und die Werte an Tag 0 wichtig waren, um Veränderungen an Tag 1 überhaupt sehen zu können. Zudem ergaben sich die erwähnten Schwierigkeiten in der Auswertung

unter Berücksichtigung von Tag 0 durch die sehr starke Expression des Haushaltsgens Rps6 an Tag 0 im Vergleich zu den restlichen Messzeitpunkten. Dies führte dazu, dass sich vor allem für die Interpretation vermindert exprimierter Gene Schwierigkeiten ergaben, wohingegen vermehrt exprimierte Gene, die an dieser Stelle identifiziert werden sollten, in ihrer Hochregulation eher unterschätzt wurden. Aus diesen Gründen finden sich auch die qPCR-Ergebnisse für Tag 0 in den folgenden Auswertungen.

*Ten eleven translocation* (Tet)-Dioxygenasen spielen in vielen DNA-Demethylierungsprozessen eine wichtige Rolle (siehe Abschnitt 1.4.4), daher war die Expression von Tet1-3 auch im Kontext der HSZ-Aktivierung interessant.

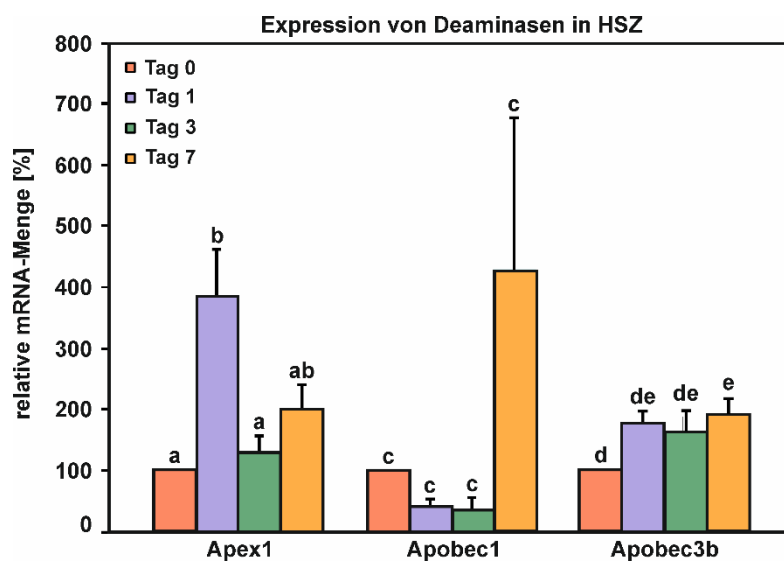
In einem Zeitraum von 0 bis 7 Tagen Kultur-induzierter Aktivierung zeigte sich bei der mRNA-Quantifizierung, dass an Tag 1, zeitgleich mit der starken DNA-Demethylierung, eine deutliche temporäre Hochregulation der Tet3-mRNA erfolgte. An Tag 3 war die Tet3-Expression schon wieder stark reduziert (Abbildung 21). Für Tet1 und Tet2 zeigte sich von der Isolation an eine starke Abnahme des mRNA-Gehalts (Abbildung 21). Eventuell ist Tet3 also im Rahmen der HSZ-Aktivierung an der DNA-Demethylierung beteiligt.



**Abbildung 21: Expression der Tet-Dioxygenasen während der HSZ-Aktivierung.** Die relative mRNA-Menge der Tet-Dioxygenasen 1-3 wurde in Kultur-induzierten HSZ an den Tagen 0, 1, 3 und 7 mittels quantitativer PCR bestimmt. Lediglich die Tet3-Expression wurde an Tag 1 des Aktivierungsprozesses signifikant hochreguliert. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen kennzeichnen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Die Varianz ist jeweils als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwertes angegeben ( $n=3-6$ ). (HSZ: Hepatische Sternzellen, Tet: *ten eleven translocation*)

Im Anschluss an die Oxidation methylierter Cytosine kann während der DNA-Demethylierung eine Deaminierung zu Thymin oder zu Hydroxyuracil erfolgen (siehe Abschnitt 1.4.4). Die Deaminasen Apex1, Apobec1 und Apobec3b werden in der Literatur häufiger im Zusammenhang mit der aktiven

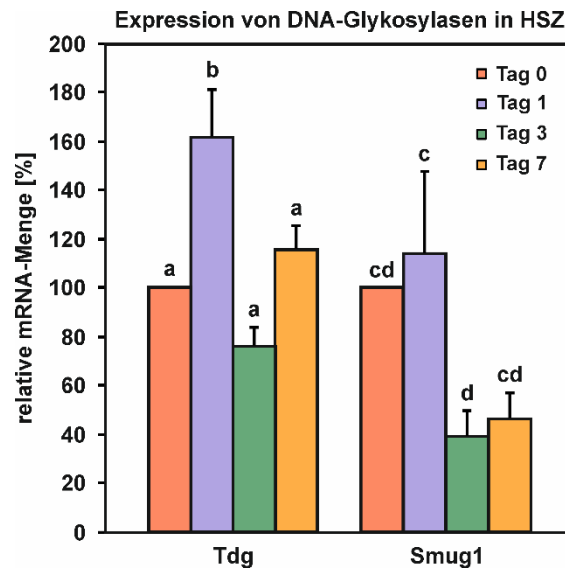
DNA-Demethylierung diskutiert, daher wurde auch ihre Expression im Verlauf der HSZ-Aktivierung bestimmt. Während Apex1 und Apobec3b an Tag 1 eine Hochregulation der Genexpression auf das fast 4-fache bzw. das 1,8-fache des Wertes in frisch isolierten HSZ aufwiesen, kam es für das Gen Apobec1 an Tag 1 und 3 der kulturinduzierten HSZ-Aktivierung zu einer verminderten Expression. An Tag 7 war dann allerdings für Apobec1 eine nicht signifikante verstärkte Expression auf das mehr als 4-fache zu beobachten. Die Ergebnisse der HSZ-Isolationen von drei Tieren wiesen zwar die gleiche ansteigende Tendenz, jedoch stark voneinander abweichende Werte auf (Abbildung 22). Die erhöhte Apex1-Expression war nur temporär und ab Tag 3 wieder deutlich geringer als an Tag 1, wohingegen die Expression des Apobec3b-Gens während des Beobachtungszeitraums auf dem erhöhten Niveau blieb, der Unterschied zu Tag 0 allerdings erst an Tag 7 signifikant wurde (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Expression verschiedener Deaminasen während der HSZ-Aktivierung.** Die relative mRNA-Menge von Apex1, sowie Apobec1 und Apobec3a wurde in Kultur-induzierten HSZ an den Tagen 0, 1, 3 und 7 mittels quantitativer PCR bestimmt. Apex1 wies eine temporär verstärkte Genexpression an Tag 1 auf, die Apobec1-Expression ging zunächst zurück, stieg dann aber zwischen Tag 3 und Tag 7 stark an, Apobec3b wies eine erhöhte Expression an Tag 1 auf, diese blieb dann über den gesamten Zeitraum der Messung stabil. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen kennzeichnen Gruppen ohne signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). Varianzen sind als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=3-6$ ). (HSZ: Hepatische Sternzellen)

Durch die zuvor beschriebene Deaminierung entstehen Basenfehlpaarungen, die im weiteren Verlauf der aktiven DNA-Demethylierung entfernt werden müssen (siehe Abschnitt 1.4.4). Die Thymin-DNA-Glykosylase (Tdg) und die *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase* (Smug1) sind DNA-Glykosylasen, die diese Aufgaben übernehmen können. Tdg findet in der Literatur außerdem deswegen häufig Erwähnung, weil es die Oxidationsprodukte von 5-Methylcytosin, 5-Formylcytosin und 5-Carboxycytosin erkennen und durch Bindung die BER und einen Austausch der modifizierten Base durch ein unmethyliertes Cytosin induzieren kann (siehe Abschnitt 1.4.4). Im Folgenden wurde daher auch untersucht, ob diese beiden DNA-Glykosylasen während des Aktivierungsprozesses

verstärkt exprimiert werden (Abbildung 23). Eine signifikante Hochregulation der Genexpression an Tag 1 der HSZ-Aktivierung ließ sich nur für Tdg nachweisen. Zwar lag die Expression von Smug1 zu diesem Zeitpunkt auch etwas höher als kurz nach der Isolation, allerdings war der Unterschied zwischen den beiden Zeitpunkten nicht signifikant. Nach Tag 1 fiel die Expression beider Gene bis zum Tag 7 ab, für Tdg fiel sie auf das Niveau in den frisch isolierten HSZ zurück, für Smug1 zeigte sich eine stärkere Abnahme der Genexpression auf ca. 40 % des Wertes an Tag 0 (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Expression verschiedener DNA-Glykosylasen während der HSZ-Aktivierung.** Die relative mRNA-Menge von Tdg und Smug1 wurde in Kultur-induzierten HSZ an den Tagen 0, 1, 3 und 7 mittels qPCR bestimmt. Eine signifikante Hochregulation der Genexpression an Tag 1 der HSZ-Aktivierung konnte nur für Tdg, nicht aber für Smug1 nachgewiesen werden. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen kennzeichnen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Varianzen sind als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=5-6$ ). (HSZ: Hepatische Sternzellen, Smug1: *single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase*, Tdg: *G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase*)

Neben Enzymen, die während des DNA-Demethylierungsprozesses eine bestimmte katalytische Funktion übernehmen, gibt es auch sogenannte *Scaffolder*-Proteine. Deren Funktion ist die Interaktion mit den an der Reaktion beteiligten funktionellen Proteinen, um diese in räumliche Nähe zueinander zu bringen und so die ablaufenden Reaktionen zu ermöglichen. Eine solche Aufgabe wird für die *growth arrest and DNA damage inducible* (Gadd)45-Proteinfamilie diskutiert (Schuermann *et al.*, 2016). Um die Bedeutung von Gadd45 für die DNA-Demethylierung in HSZ weiter zu erforschen, wurde die Expression der Familienmitglieder Gadd45 $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  während des Aktivierungsprozesses bestimmt. Zusätzlich wurde noch die Expression des Ringfingerproteins 4 (Rnf4) untersucht, ein Protein dessen Funktion unter anderen die Modulation der DNA-Demethylierung ist und für das auch eine Interaktion mit Tdg nachgewiesen ist (Hu *et al.*, 2010)

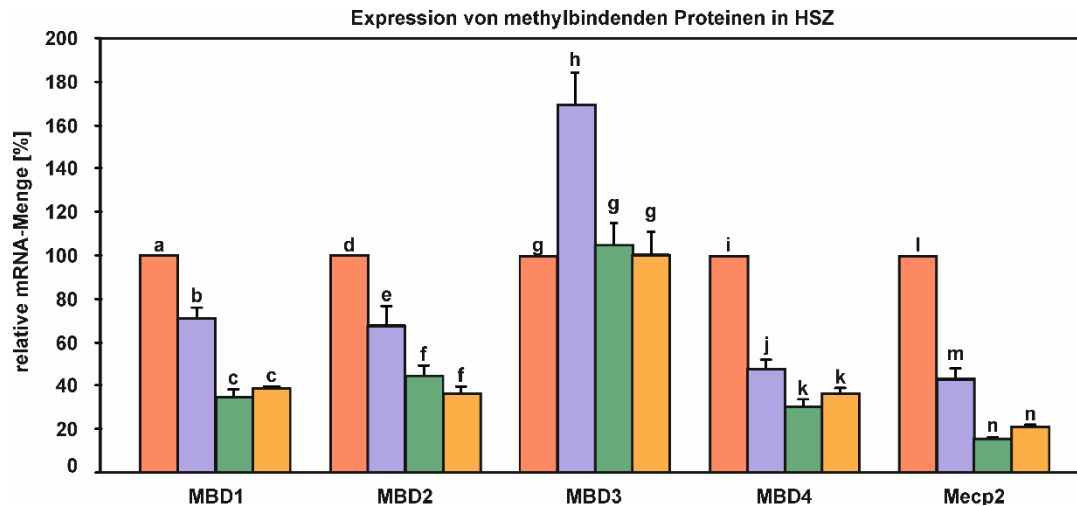


**Abbildung 24: Expression verschiedener Scaffolder-Proteine während der HSZ-Aktivierung.** Die relative mRNA-Menge von Proteinen der Gadd45-Familie und von Rnf4 wurde in Kultur-induzierten HSZ an den Tagen 0, 1, 3 und 7 mittels quantitativer PCR bestimmt. Eine signifikante Hochregulation der Genexpression an Tag 1 der HSZ-Aktivierung konnte nur für Gadd45 $\alpha$  nachgewiesen werden. Gadd45 $\beta$  und  $\gamma$  wurden im Verlauf der HSZ-Aktivierung herunterreguliert. Die Rnf4-Expression blieb an Tag 1 zunächst stabil, nahm dann aber bis Tag 3 ab. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA), gleichnamige Buchstaben oberhalb der Säulen kennzeichnen dabei Gruppen ohne signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ). Varianzen sind als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=3-5$ ). (Gadd: *growth arrest and DNA damage inducible protein*, HSZ: Hepatische Sternzellen, Rnf4: *ringfinger protein 4*)

Von den drei Gadd45-Familienmitgliedern wurde nur Gadd45 $\alpha$  an Tag 1 der HSZ-Aktivierung signifikant hochreguliert (Abbildung 24). Danach fiel die Expression an Tag 3 und 7 auf das Ursprungsniveau zurück. Sowohl die Expression von Gadd45 $\beta$  als auch von Gadd45 $\gamma$  wurde im Zuge der HSZ-Aktivierung um etwa die Hälfte der Expression in frisch isolierten Sternzellen herunterreguliert. Die Expression von Rnf4 blieb an Tag 1 der Aktivierung stabil und nahm erst zwischen Tag 1 und 3 ab (Abbildung 24).

In der Methylbindedomäne (MBD)-Familie sind verschiedene Proteine zusammengefasst, die eine Domäne zur Bindung von methylierter DNA besitzen. Aufgrund dieser Fähigkeit ist es denkbar, dass auch diese Proteinfamilie an der Regulation der aktiven DNA-Demethylierung beteiligt ist. Zudem ist bekannt, dass MBD3 bei der Induktion der DNA-Demethylierung eine Rolle spielt (Brown *et al.*, 2008). Daher wurde im Folgenden die Expression von MBD1-4 und MeCP2 während der HSZ-Aktivierung untersucht (Abbildung 25). Sowohl MBD1, als auch MBD2, MBD4 und MeCP2 wurden während des Aktivierungsprozesses stark vermindert exprimiert. Lediglich MBD3 zeigte an Tag 1 eine signifikante Hochregulation der mRNA-Menge (Abbildung 25). Diese Hochregulation war allerdings nur temporär, zwischen Tag 1 und 3 sank die Expression wieder auf das Ursprungsniveau der frisch isolierten Zellen.

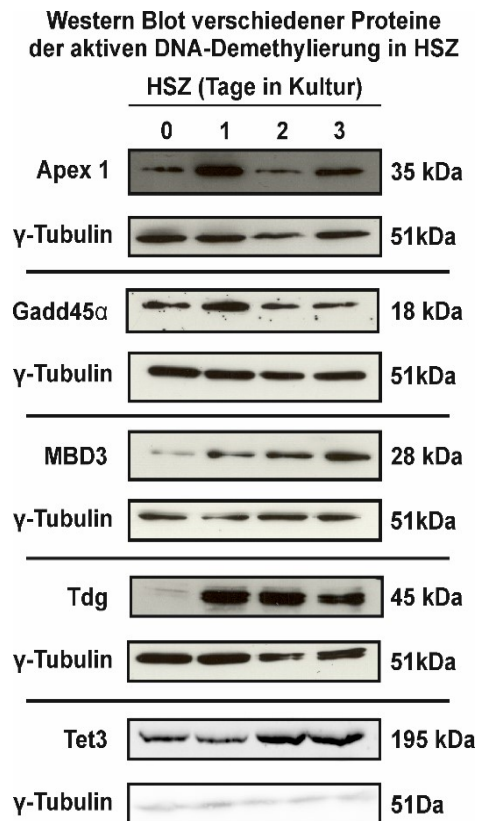




**Abbildung 25: Expression verschiedener methylbindender Proteine während der HSZ-Aktivierung.** Die relative mRNA-Menge von MBD1 bis 4 und MeCP2 wurde in Kultur-aktivierten HSZ an Tag 0, 1, 3 und 7 mittels quantitativer PCR bestimmt. Eine temporäre signifikante Hochregulation der Genexpression an Tag 1 der HSZ-Aktivierung konnte nur für MBD3 nachgewiesen werden. Alle anderen untersuchten Gene wiesen einen konstanten Abfall der mRNA-Menge im Verlauf der HSZ-Aktivierung auf. Die statistische Auswertung erfolgte über eine Varianzanalyse (ANOVA). Gleiche Buchstaben oberhalb der Säulen kennzeichnen Gruppen mit nicht signifikanten Unterschieden ( $p < 0,05$ ). Varianzen sind als positiver Standardfehler des jeweiligen Mittelwerts angegeben ( $n=3-6$ ). (HSZ: Hepatische Sternzellen, MBD: methyl binding domain, MeCP2: methyl-CpG-binding protein 2)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression des 5mC-oxidierenden Enzyms Tet3, der Deaminasen Apex1 und Apobec3b, der DNA-Glykosylase Tdg sowie des Scaffold-Proteins Gadd45 $\alpha$  und des methylbindenden Proteins MBD3 an Tag 1 der Kultur-induzierten HSZ-Aktivierung signifikant hochreguliert wurde. Da die stärkste DNA-Demethylierung schon sehr früh im Aktivierungsprozess zwischen Tag 0 und 1 stattfand, sind die oben genannten Proteine potentiell wichtig für diesen Prozess.

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der Genexpression auch zu einer Erhöhung des jeweiligen Proteinlevels führte, wurden für Tet3, Apex1, Tdg, Gadd45 $\alpha$  und MBD3 Western Blot Analysen durchgeführt (Abbildung 26). Die verstärkte Transkription der fünf Gene wurde auch von einer erhöhten Translation begleitet. Apex1 und Gadd45 $\alpha$  wiesen nur eine kurzfristige Erhöhung der Proteinmenge an Tag 1 auf, während MBD3 und Tdg verstärkt ab Tag 1 nachzuweisen waren und die Proteinmenge auch an den darauffolgenden Tagen auf einem erhöhten Niveau blieb. Tet3 war an allen Tagen der HSZ-Aktivierung nachweisbar, allerdings war ein erhöhter Proteingehalt an den Tagen 3 und 7 nachzuweisen.



**Abbildung 26: Western Blot Analysen möglicher Kandidaten für die DNA-Demethylierung während der HSZ-Aktivierung.** HSZ wurden für die angegebene Zeit auf Plastik kultiviert und dadurch aktiviert. Nach Gewinnung der Proteinlysate wurden diese im Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente in allen Fällen  $\gamma$ -Tubulin (n=3). (Gadd45 $\alpha$ : *growth arrest and DNA damage inducible protein  $\alpha$* , HSZ: Hepatische Sternzellen, MBD3: *methyl-CpG-binding domain protein 3*; Tdg: *G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase*, Tet3: *ten eleven translocation 3*)

## 5 Diskussion

### 5.1 Veränderung der globalen DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung

Stammzellen können durch ihr Entwicklungspotenzial von ausdifferenzierten somatischen Zellen abgegrenzt werden. Alle Zellen eines Körpers gehen ursprünglich aus pluripotenten Zellen hervor, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie Zelltypen aller drei embryonalen Keimblätter, Ektoderm, Mesoderm und Entoderm bilden können (siehe Abschnitt 1.3). Diese Pluripotenz geht im Laufe der Entwicklung und der Ausbildung verschiedener Zelltypen mit zelltypspezifischer Genexpression und Funktion verloren. Auf molekularer Ebene spiegelt sich diese Beobachtung in der Veränderung von DNA- und Chromatinmodifikationen wieder. So korrelieren während der Embryogenese die Nanog- und *octamer binding protein 4* (Oct4) -Expression mit der Pluripotenz, eine abnehmende Pluripotenz geht einher mit einer verringerten Zugänglichkeit des Chromatins im Bereich der Gene für Oct4 und Nanog, sowie mit einer erhöhten DNA-Methylierung des Nanog-Promoters (Osorno *et al.*, 2012). Die Entdeckung der Pluripotenzfaktoren cMyc, Klf4, Oct4 und Sox2 führte dazu, dass der Prozess der Differenzierung nun auch rückgängig gemacht werden kann, sodass ausdifferenzierte Zellen zurück in einen pluripotenten Zustand geführt werden können (Takahashi & Yamanaka, 2006) und auf diese Weise induzierte pluripotente Stammzellen (iPSZ) entstehen. Dazu müssen die epigenetischen Informationen, die eine ausdifferenzierte Zelle charakterisieren, gelöscht werden, damit das Chromatin in einen weniger differenzierten Zustand überführt wird. Dieser Prozess, der Auswirkungen auf das gesamte Genom hat, wird auch als epigenetische Reprogrammierung bezeichnet (Simonsson & Gurdon, 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass HSZ während der Kultur-induzierten Aktivierung starke Veränderungen in der DNA-Methylierung durchlaufen. Auf globaler Ebene wurde zunächst eine starke DNA-Demethylierung während der frühen HSZ-Aktivierung nachgewiesen (siehe Abschnitt 4.1), ein Prozess, der an die bereits bekannte epigenetische Reprogrammierung während der Embryonalentwicklung (Hajkova *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2002), die Generierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (Mikkelsen *et al.*, 2008) und die Entstehung von Tumoren (Gama-Sosa *et al.*, 1983; Ehrlich, 2002) erinnert. In den benannten Fällen ist der Prozess der globalen DNA-Demethylierung an der Ausbildung eines Entwicklungspotentials beteiligt, welches im Anschluss durch eine spezifische Remethylierung wieder eingeschränkt werden kann. Dass HSZ ebenfalls einen solchen Prozess durchlaufen, ist ein Hinweis darauf, dass auch sie durch die Aktivierung einen potenteren Status erreichen, von dem aus sie sich in funktionale Zelltypen, wie beispielsweise Hepatozyten differenzieren und dadurch zur Leberregeneration beitragen können. Die beobachtete globale DNA-Demethylierung erweitert die bisherigen Kenntnisse über die HSZ als mesenchymale Stammzelle. So

kann davon ausgegangen werden, dass das Differenzierungspotential der HSZ schon im ruhenden Zustand in der Stammzellnische vorhanden ist, eine aktive und entwicklungsfähige Stammzelle allerdings erst während des Aktivierungsprozesses entsteht (Kordes *et al.*, 2013). Ein solches Modell, in dem zwischen potenziellem und aktivem Stammzellstatus unterschieden wird, wurde von Huch und Dollè postuliert (Huch & Dollè, 2016).

Die DNA-Demethylierung im paternalen und maternalen Vorkern des Präimplantationsembryos beruht sowohl auf aktiven, als auch passiven sowie gekoppelten Mechanismen, deren Zusammenspiel noch nicht endgültig aufgeklärt ist (Gu *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2014; Oswald *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2014). Während der HSZ-Aktivierung wurde beobachtet, dass die DNA-Demethylierung von einer Inhibition der Replikation durch L-Mimosin nicht verhindert werden konnte (siehe Abschnitt 4.1). Daher kann davon ausgegangen werden, dass hauptsächlich ein aktiver Mechanismus für die globale DNA-Demethylierung in aktivierenden HSZ verantwortlich ist. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass Enzyme mit einer Rolle in der aktiven DNA-Demethylierung durch BER sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene an Tag 1 der Aktivierung vermehrt nachzuweisen waren (siehe Abschnitt 4.9).

Für die aktive DNA-Demethylierung während der epigenetischen Reprogrammierung in der Zygote ist die Oxidation von 5mC ein möglicher Ausgangspunkt, denn gleichzeitig mit der Abnahme des 5mC-Gehalts kann 5hmC verstärkt nachgewiesen werden (Gu *et al.*, 2011). In der Mauszygote wird von den drei Tet-Isoformen Tet3 am stärksten exprimiert, KO-Studien zeigten, dass maternal exprimiertes Tet3 für die paternale DNA-Demethylierung essenziell ist und das Fehlen von Tet3 zu einer gestörten Embryonalentwicklung führt (Gu *et al.*, 2011). Wie während der sehr frühen Embryonalentwicklung wurde in aktivierenden HSZ eine verstärkte Tet3-Expression nachgewiesen (siehe Abbildung 21). Tet1 und Tet2 hingegen, die auch weniger in der Zygote als in der inneren Zellmasse und in adulten Geweben zu finden sind (Rasmussen & Helin, 2016), wiesen eine verminderte Expression auf. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass während der HSZ-Aktivierung eine epigenetische Reprogrammierung analog zur Embryonalentwicklung stattfindet. Die DNA-Glykosylase Tdg wurde ebenfalls zu Beginn der HSZ-Aktivierung verstärkt exprimiert (siehe Abbildung 22). Zu ihrer Beteiligung am DNA-Demethylierungsprozess liefern verschiedene Studien unterschiedliche Aussagen. Während eine KO-Studie eine DNA-Demethylierung unabhängig von Tdg nachweist (Guo *et al.*, 2014), legt eine weitere KO-Studie eine Tdg-abhängige DNA-Demethylierung und Entwicklung nahe (Cortellino *et al.*, 2011). Außerdem sind Tdg, aber auch die drei Tet-Isoformen essentiell für die Reprogrammierung von embryonalen Fibroblasten aus der Maus in iPSZ (Hu *et al.*, 2014). Auch für das methylbindende Protein MBD3 konnte in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulation während des Aktivierungsprozesses nachgewiesen werden (siehe Abbildung 25). Eine Beteiligung von MBD3 an der DNA-Demethylierung

wird bereits in der Literatur diskutiert, so führt eine Überexpression des Proteins zu einer globalen DNA-Demethylierung und zur Demethylierung an unterschiedlichen Promotoren (Brown *et al.*, 2008). Eine Beschreibung der Funktion von MBD3 über die Bindung an methylierte Sequenzen hinaus ist allerdings noch nicht vorhanden. Trotz vieler Hinweise darauf, dass die BER an DNA-Demethylierungsprozessen beteiligt ist, ist noch nicht aufgeklärt, wie die methylierte DNA erkannt wird und wie die beteiligten Komponenten rekrutiert und für eine effektive Katalyse zusammengebracht werden. MBD3 könnte als methylbindendes Protein die Sequenzspezifität gewährleisten. Gadd45 $\alpha$  wird hingegen als sogenanntes *Scaffold*-Protein diskutiert, welches an der Regulation der DNA-Demethylierung und der Rekrutierung der einzelnen Faktoren beteiligt ist (Schuermann *et al.*, 2016). Ein wichtiger Hinweis auf eine solche Rolle ist die Tatsache, dass Gadd45 $\alpha$  mit allen wichtigen Enzymen der BER interagiert, dazu gehören Tet1 (Kienhofer *et al.*, 2015), Tdg (Cortellino *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015) und die Deaminasen (Cortellino *et al.*, 2011). Tet2 und Tet3 wurden in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Darüber hinaus konnte bereits nachgewiesen werden, dass Gadd45 $\alpha$  sowohl die Aktivität von Tet1, als auch von Tdg verstärken kann (Kienhofer *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass während der HSZ-Aktivierung eine massive globale DNA-Demethylierung aufgetreten ist, die auf einem aktiven DNA-Demethylierungsmechanismus beruhte. Während dieser Prozess ablief, ließ sich gleichzeitig eine Hochregulation verschiedener Proteine beobachten, die, wie schon in anderen Zusammenhängen gezeigt werden konnte, an der BER beteiligt sind. Ein mögliches Szenario zur DNA-Demethylierung während der HSZ-Aktivierung ist daher die Oxidation von 5mC zu 5hmC durch Tet3 und eine anschließende Deaminierung durch Apex1 oder Apobec 3b. Tdg ist das Verbindungsglied zur eigentlichen BER, es könnte die Base des Nukleotids entfernen und so über die entstandene abasische Stelle für den Beginn der DNA-Reparatur sorgen. Gadd45 $\alpha$  könnte die Aufgabe der Rekrutierung übernehmen und eine Interaktionsplattform für die restlichen Enzyme bilden. Die Rolle von MBD3 ist noch unklar, eventuell ist es für die Erkennung der methylierten Regionen notwendig. An dieser Stelle ist noch der Nachweis nötig, dass diese Enzyme tatsächlich an der DNA-Demethylierung während der HSZ-Aktivierung beteiligt sind. Dafür müssen diese über Inhibitoren in ihrer Funktion gehemmt werden oder die Translation ihrer mRNA über RNA-Interferenz verhindert werden. Sollten diese Experimente die starke DNA-Demethylierung verhindern, ist dies ein Zeichen für eine Beteiligung des entsprechenden Enzyms. Sollte der Prozess durch diese Intervention jedoch nicht aufgehalten werden können, ist das Enzym entweder nicht beteiligt oder es existieren Alternativmechanismen über welche die DNA-Demethylierung stattfinden kann, wenn dieser Weg blockiert ist. Wie schon in der Einleitung gezeigt (siehe Abschnitt 1.4.4), existieren verschiedene Theorien darüber, wie die DNA-Demethylierung stattfinden kann und verschiedene enzymatische Mechanismen können auf unterschiedliche Weise miteinander kombiniert werden.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang Tdg, da es für fast alle DNA-Demethylierungswege, die über BER funktionieren, benötigt wird. Es stellt sich darüber hinaus die Frage, ob ein Verlust an Tdg durch andere DNA-Glykosylasen wie MBD4, Smug oder die Neil-Glykosylasen 1-3 kompensiert werden kann.

Es ist erstaunlich, dass Zellen den BER-Mechanismus für die globale DNA-Demethylierung verwenden, denn dieser Reaktionsweg beinhaltet einen Einzelstrangbruch der DNA. Vor allem in Hinblick auf die 5mC-Demethylierung ist dies für die Zelle sehr riskant. CpG-Dinukleotide sind kurze Palindrome, sodass sie an gleicher Stelle auch immer im revers-komplementären Strang vorliegen. Daher besteht bei CpG-Dinukleotiden die Gefahr, dass gehäuft Doppelstrangbrüche auftreten, wenn die CpG-Dinukleotide bei der globalen DNA-Demethylierung an vielen Stellen im Genom gleichzeitig aktiv demethyliert werden. Dies bedeutet eine große Gefahr für die Integrität des Genoms. Dass während der globalen DNA-Demethylierung in aktivierenden HSZ vermehrt Doppelstrangbrüche auftraten, zeigte sich an dem erhöhten Nachweis der phosphorylierten Histonvariante H2A.X (siehe Abbildung 20), einem Indikator für Doppelstrangbrüche (Rogakou *et al.*, 1998). An dieser Stelle wäre es interessant, weiter zu erforschen, welche Mechanismen in den HSZ genutzt werden, um das Genom vor diesen negativen Einflüssen zu schützen. Eventuell markiert  $\gamma$ H2A.X die Doppelstrangbrüche, um Proteine zu rekrutieren deren Funktion es ist, die sensiblen Stellen, an denen DNA-Demethylierung stattfindet, zu schützen oder zu stabilisieren bis die DNA-Reparatur abgeschlossen ist. Andere Autoren propagieren als weitere Möglichkeit eine sequenzielle Demethylierung der beiden Stränge, um das Auftreten der Doppelstrangbrüche zu verhindern (Weber *et al.*, 2016). In einem solchen Fall wäre allerdings nicht mit einer Zunahme an  $\gamma$ H2A.X zu rechnen.

## 5.2 Veränderung der genomweiten DNA-Methylierung während der HSZ-Aktivierung

Die Bestimmung der genomweiten DNA-Methylierung mittels RRBS für die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass im Verlauf der frühen HSZ-Aktivierung in Promotoren und Genkörpern vor allem zunehmende DNA-Methylierungen zu beobachten waren (siehe Abbildung 8). Hypomethylierungen traten hingegen in einem viel geringeren Maße auf.

Dies stand in einem klaren Kontrast zu den Ergebnissen aus der Untersuchung der globalen DNA-Methylierung, die während der HSZ-Aktivierung deutlich abnahm. Die starke DNA-Demethylierung muss also in Bereichen erfolgen, die außerhalb von Promotoren und Genkörpern liegen. Als mögliche Bereiche wurden in der vorliegenden Arbeit die repetitiven Elemente untersucht, die zur Wahrung der Integrität im Genom normalerweise stark methyliert vorliegen (Yoder *et al.*, 1997). Außerdem können etwa die Hälfte der CpG-Dinukleotide im Genom den repetitiven Elementen zugeordnet werden (Moyzis *et al.*, 1989), sodass Veränderungen in diesem Bereich den oben angesprochenen Unterschied ausmachen könnten. Zur DNA-Methylierung repetitiver Elemente während der epigenetischen

Reprogrammierung gibt es unterschiedliche Aussagen. So besagt eine Studie, dass LINE1- und *inhibitor of apoptosis domain* (IAP)-Wiederholungen während der globalen DNA-Demethylierung in primordialen Keimzellen methyliert bleiben, um eine transkriptionelle Aktivierung zu verhindern (Hajkova *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu zeigten weitere Studien, dass die Expression von LINE1- und ERV-ähnlichen Elementen während der epigenetischen Reprogrammierung durch DNA-Demethylierung sowohl auf dem paternalen als auch dem maternalen Genom aktiviert wird (Inoue *et al.*, 2012), wobei die Expression von LINE1-Elementen sogar für die Embryonalentwicklung notwendig sein soll (Beraldi *et al.*, 2006).

Während der HSZ-Aktivierung kam es jedoch zu keiner signifikanten Veränderung der DNA-Methylierung innerhalb der häufigsten repetitiven Elemente (siehe Abbildung 19). Folglich muss die nachgewiesene DNA-Demethylierung in anderen Bereichen des Genoms erfolgen. Es könnte sich dabei um viele, einzeln liegende CpG-Dinukleotide handeln, deren Methylierungsstatus mit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RRBS-Sequenzierung nicht zu bestimmen war. Einzeln liegende CpG-Dinukleotide lassen sich nur über eine komplette Sequenzierung des Genoms identifizieren und untersuchen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei den demethylierten Cytosinen um Nicht-CpG-Methylierungen (CpA, CpT, CpC) handelt, die bereits mit der Regulation der Pluripotenz in Zusammenhang gebracht wurden (Lister *et al.*, 2009). Der Antikörper, der für die globale Detektion eingesetzt wurde, erkennt 5mC unabhängig davon in welchem Sequenzkontext die modifizierte Base auftritt, wohingegen im *Array* nur die Methylierung von CpG-Dinukleotiden untersucht wurde, dieser Sachverhalt könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Mehrere Studien zeigen, dass die Nicht-CpG-Methylierungen mit dem Grad der Differenzierung abnehmen, so folgt in humanen embryonalen Stammzellen auf etwa ein Viertel der methylierten Cytosine ein Adenosin, Thymin oder Cytosin. In ausdifferenzierten Fibroblasten lassen sich CpG-unabhängige-DNA-Methylierungen nicht nachweisen, wohingegen iPSZ diese aufweisen (Laurent *et al.*, 2010; Lister *et al.*, 2009; Ziller *et al.*, 2011). Aus diesen Gründen wird für die Nicht-CpG-Methylierung eine Schlüsselrolle im Rahmen der Entwicklung und des Erhalts des pluripotenten Zustands postuliert (Lister *et al.*, 2009). Diese Nicht-CpG-Methylierungen könnten auch in ruhenden HSZ vorliegen, die adulte, leberständige Stammzellen sind. Es gibt allerdings auch Berichte darüber, dass ausdifferenzierte Zellen, z.B. im Gehirn ebenfalls Nicht-CpG-Methylierungen aufweisen und dass diese Modifikationen an der Regulation der Transkription beteiligt sind (Pinney *et al.*, 2014), sodass die tatsächliche Rolle der Nicht-CpG-Methylierung noch nicht geklärt ist. Wie CpG-Methylierungen korrelieren auch DNA-Methylierungen ohne CpG-Kontext im Genkörper positiv mit der Genexpression (Lister *et al.*, 2009). Um die aktivierenden HSZ auf eine differentielle Nicht-CpG-Methylierung hin zu untersuchen, können verschiedene Methoden angewandt werden. Es stehen allerdings aktuell nur zwei Restriktionsenzyme für den Nicht-CpG-methylierungsspezifischen Nachweis zur Verfügung, sodass nach dem Einsatz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen,

Bisulfitmodifikation oder der Anreicherung methylierter DNA über spezifische Antikörper oder MBD-Proteine immer eine Sequenzierung erfolgen muss (Pinney *et al.*, 2014).

Eine vertiefende Analyse der DMG erfolgte über die GO-Analyse, die Auskunft darüber gab, welche biologischen Funktionen von den DMG erfüllt werden (siehe Tabelle 12). Einige wichtige Funktionen der DMG sind bereits für die HSZ-Aktivierung bekannt. So waren von der differentiellen DNA-Methylierung Gene der Zellmigration betroffen. Dies ist naheliegend, denn aktivierte HSZ werden mobiler (Friedman *et al.*, 2008). Außerdem sind HSZ bisher vorrangig für ihre Beteiligung an der Fibrose durch EZM-Produktion bekannt, sodass auch das Auftreten der GO-Begriffe „Regulation der Sekretion“, „Organisation der EZM“ und „Wundheilung“ nicht überraschend war. Auch die Beteiligung aktivierter HSZ an Prozessen des Immunsystems ist bereits bekannt (Paik *et al.*, 2003; Schildberg *et al.*, 2011). Stressassoziierte Gene waren wahrscheinlich aufgrund des Isolationsprozesses und der Kultur auf Plastik von der differentiellen Methylierung betroffen. Eine im Vergleich zu den zuvor genannten GO-Begriffen hohe Anzahl an differentiell methylierten Genen, nämlich 820 von insgesamt 3180, hatten eine Funktion im Kontext der „Zelldifferenzierung“. Dynamische Veränderungen in Differenzierungs-assoziierten Genen sind ein weiterer Hinweis darauf, dass die HSZ eine adulte Stammzelle mit Differenzierungspotential darstellt. Die starke Dynamik der DNA-Methylierungen vor allem in Genen, die an der Differenzierung von Zellen beteiligt sind, lässt vermuten, dass der frühe Aktivierungsprozess für das Schicksal der HSZ sehr wichtig ist, entweder zur Ausbildung des Entwicklungspotentials oder bereits zur Kanalisierung einer möglichen Differenzierung.

### 5.3 DNA-Methylierungs- und Genexpressionsänderungen während der HSZ-Aktivierung

Die Untersuchung des Transkriptoms in HSZ innerhalb der ersten Tage der Aktivierung zeigte deutlich, dass zu Beginn des Prozesses die stärksten Veränderungen in der Genexpression auftraten (siehe Abbildung 11). Im Verlauf der Aktivierung waren immer weniger Gene von Veränderungen betroffen. Außerdem wurde sichtbar, dass eine höhere Anzahl an Genen verstärkt als vermindert exprimiert wurde. Dies passt gut zu den Daten des DNA-Methylierungsarrays, da dort vor allem zunehmende Methylierung in Genkörpern nachgewiesen wurde und Genkörpermethylierungen positiv mit der Expression korrelieren sollen (Jones, 1999). Auch dieser Befund unterstreicht die These, dass die ersten Tage der Aktivierung eine entscheidende Phase darstellen, denn in dieser Zeit finden sehr viele Veränderungen im Expressionsmuster der HSZ statt. In der späten Aktivierungsphase haben die Zellen dann eine stabilere Genexpression. In diesem Kontext wäre es interessant zu untersuchen, ob dieser stabilere Zustand ein determiniertes Schicksal bedeutet, die HSZ also bereits eine Differenzierung eingegangen sind.



Die GO-Analyse wurde getrennt für Gene mit hoch- und herunterregulierter Expression durchgeführt (siehe Tabelle 13). Die Ergebnisse ähnelten sehr der Analyse für die differentiell methylierten Gene. Gene, die an der Regulation von Prozessen des Immunsystems beteiligt sind, wurden während der HSZ-Aktivierung vermindert exprimiert. Dafür wurden Gene, die an Prozessen beteiligt sind, die für aktivierte HSZ typisch sind, „EZM-Organisation“, „Wundheilung“ und „Zellzyklus“ verstärkt exprimiert. Stress-, sowie migrations- und sekretionsassoziierte Gene wurden teilweise verstärkt, teilweise vermindert exprimiert, diese Funktionen waren in beiden Analysen zu finden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die aktivierenden HSZ in diesen Funktionen starke Änderungen durchlaufen und diese Prozesse sehr wichtig für die Aktivierung sind. Außerdem traten in beiden Analysen wieder die differenzierungsassoziierten Gene hervor. Die starke Dynamik der Gene im Kontext der Differenzierung, nicht nur auf Methylo- sondern auch auf Transkriptomebene zeigt auf, dass während der Aktivierung Differenzierungsprozesse in den Zellen ablaufen oder vorbereitet werden.

Bei der gemeinsamen Auswertung der differentiell methylierten und exprimierten Gene wurde zwischen Promoter- und Genkörpermethylierung unterschieden, da diese zwei Modifikationen unterschiedliche Einflüsse auf die Genexpression haben. Für die differentiell methylierten Promoterregionen ergab sich eine negative Korrelation mit der Genexpression (siehe Abbildung 13, A). Das heißt, mit zunehmender Methylierung ging die Expression des assoziierten Gens zurück. Damit konnte die allgemein anerkannte Annahme, dass die Promotermethylierung einen negativen Einfluss auf die Genexpression hat (Jones, 1999), bestätigt werden. Für die differentiell methylierten Genkörper wurde aufgrund der bereits vorhandenen Literatur erwartet, dass eine positive Korrelation mit der Genexpression besteht (Jones, 1999), diese Annahme konnte nicht bestätigt werden. Eine klare Korrelation zwischen den beiden Prozessen ließ sich nicht erkennen (siehe Abbildung 13, B). Dafür gibt es verschiedene mögliche Ursachen. Zum einen könnte dieses Ergebnis ein Hinweis darauf sein, dass die Genkörpermethylierung über die Regulation der Genexpression hinaus noch weitere Aufgaben erfüllt. So wird der Genkörpermethylierung auch die Regulation von Enhanceraktivität (Aran *et al.*, 2013; Bogdanović *et al.*, 2016) und eine Rolle im mRNA-Splicing (Wan *et al.*, 2013) zugeschrieben. Ein weiterer Grund für dieses Ergebnis könnte innerhalb des DNA-Methylierungs-Arrays selbst liegen. Identifizierte DMR wurden innerhalb des Arrays entweder den Promotoren oder Introns/Exons zugeordnet. Einige Regionen, die dem Genkörper zugeordnet wurden, liegen allerdings so nah an der Transkriptionsstartstelle des dazugehörigen Gens, dass sie eventuell eher zur Promoterregion des Gens gehören. Durch die Zuordnung zum Genkörper könnte es so zu einer Verzerrung der Ergebnisse gekommen sein.

#### 5.4 Genspezifische Analyse der DNA-Methylierungs- und Genexpressionsveränderungen

Zur weiteren Charakterisierung der epigenetischen Regulation des HSZ-Aktivierungsprozesses wurden Gene ausgewählt, die sowohl im DNA-Methylierungsarray als auch in den Genexpressionsarrays signifikante Unterschiede aufwiesen. Die Ergebnisse aus den Arrays wurden dann mittels qPCR und BS-Sequenzierung verifiziert. Kriterien zur Auswahl dieser Gene waren zum einen die Stärke der Veränderung als auch bereits bekannte Funktionen der Gene, die sie im Kontext der HSZ-Aktivierung interessant machten.

Für die in dieser Arbeit aufgeführten Gene war die Validierung der Ergebnisse aus den Arrays erfolgreich. Außerdem wurde gezeigt, dass die Promotermethylierungen negativ und die Genkörpermethylierungen, zumindest bei den hier untersuchten Genen, positiv mit der Genexpression korrelierten.

Zu den ausgewählten Genen gehört das kürzlich als Marker ruhender Sternzellen identifizierte Sparcl1 (Coll *et al.*, 2015), welches bei abnehmender Genkörper-Methylierung auch eine verminderte Expression im Verlauf der Aktivierung aufwies (siehe Abbildung 17, K+L). Die Expression von Sparcl1 in ruhenden Sternzellen und der Verlust der Expression im Rahmen der Aktivierung konnten bestätigt werden.

Ein wichtiger Prozess während der HSZ-Aktivierung ist die zunehmende Migration der Zellen. Sehr viele Gene, deren Produkte in anderen Zusammenhängen antimigrativ wirken, wurden während der HSZ-Aktivierung vermindert exprimiert. Dazu gehören Lhx6 (siehe Abbildung 17, I+J), Mmrn2 (siehe Abbildung 16, G+H), Robo4 (siehe Abbildung 16, I+J) und Lyve 1 (siehe Abbildung 16, C+D). Das Konzept der Stammzellnische besagt, wie schon in der Einleitung erwähnt, dass adulte Stammzellen sich in einem geschützten Milieu aufhalten, in dem ihr undifferenzierter und selbstreplizierender Zustand erhalten bleibt (Fuchs *et al.*, 2004). Auch HSZ besitzen eine Stammzellnische mit charakteristischen Eigenschaften, wie die Sdf1-CXCR4-Interaktion zwischen SEZ und HSZ, die Zusammensetzung der Basallamina und eine sympathische Innervierung (Sawitza *et al.*, 2009). In ihrer Stammzellnische, dem Disseschen Raum, halten sich die HSZ im ruhenden Zustand auf. Adulte Stammzellen werden als Reservoir benötigt, um bei Schädigungen durch Differenzierung zur Regeneration beizutragen. Um diese Aufgabe zu erfüllen, müssen die Stammzellen aus ihrer Nische mobilisiert werden, damit sie an den Ort der Schädigung gelangen können. Neurale Progenitorzellen werden beispielsweise bei einer schädlichen Demyelinisierung durch einen aktiven EGF-Signalweg in ihrer Nische mobilisiert und wandern zum Ort der Schädigung (Klingener *et al.*, 2014). Ebenso wurde gezeigt, dass der Verlust der Interaktion zwischen Stammzellen und residenten, ausdifferenzierten Zellen der Nische im Falle der

Satellitenzellen, den muskulären Stammzellen, zu einer Mobilisierung der Zellen aus der Nische heraus und zu einer verbesserten Muskelregeneration führt (Pisconti *et al.*, 2016). Der Verlust der HSZ-Lokalisation im Disseschen Raum nach Leberschädigung könnte durch die Herunterregulation der antimigrativen Kandidatengene erfolgen. Ein vielversprechender Kandidat ist dabei auch die miRNA 126, denn es ist bereits bekannt, dass die Expression dieser miRNA während der HSZ-Aktivierung sinkt (Gong *et al.*, 2014). Eine artifizielle Überexpression hingegen verhindert die Aktivierung und die Migration der HSZ (Gong, 2014). Ein Ziel der miR126 ist das Adaptermolekül Crk, das an der positiven Regulation der Migration beteiligt ist und während der HSZ-Aktivierung vermehrt exprimiert wird (Gong *et al.*, 2014). Die von uns durchgeführten Genexpressionsarrays zeigen allerdings keine veränderte Crk-Expression während der HSZ-Aktivierung (Arraydaten sind in der Datenbank *ArrayExpress* einsehbar, siehe Kapitel 3.3.1). Die Suche nach weiteren Zielen der miR126 in einer entsprechenden Online-Datenbank führte zur Identifikation von *Inpp5d/Ship1* ([www.mirdb.org/cgi-bin/searchType=miRNA&searchBox=rno-miR126a-5p&full=1](http://www.mirdb.org/cgi-bin/searchType=miRNA&searchBox=rno-miR126a-5p&full=1), 17.11.2016). Die Expression von *Inpp5d/Ship1* stieg laut Expressionsarrays nach einem starken Abfall zwischen Tag 1 und Tag 3 der HSZ-Aktivierung an Tag 7 wieder an (Arraydaten sind in der Datenbank *ArrayExpress* einsehbar, siehe Kapitel 3.3.1). *Inpp5d/Ship1* ist bereits aus Neutrophilen als negativer Regulator der Zelladhäsion bekannt, die *loss of function*-Situation führt zu einem Verlust der Zellpolarität und verstärkter Zelladhäsion (Mondal *et al.*, 2012). Der Verlust an miR126 während der HSZ-Aktivierung (siehe Abbildung 16, E+F) könnte zur verstärkten Expression von *Inpp5d/Ship1* führen, welche dann einen positiven Einfluss auf die Zellmigration hat. In weiterführenden Experimenten könnte mit Hilfe von Interaktionsassays die Interaktion zwischen miR126 und der *Inpp5d*-mRNA genauer untersucht und zum Beispiel der Einfluss einer miR126-Überexpression auf *Inpp5d* und die HSZ-Aktivierung bestimmt werden. Dabei wäre auch die Identifikation der Halbwertszeit von der miRNA126 wichtig, um den Einbruch der *Inpp5d*-Expression zwischen Tag 1 und Tag 3 der HSZ-Aktivierung erklären zu können. Auch *Mmrn2* kommt als Inhibitor der Zellmigration infrage, denn der antimigrative Effekt dieses Proteins wurde schon für Endothelzellen im Rahmen der Angiogenese nachgewiesen (Lorenzon *et al.*, 2012). *Lyve1* ist ein Rezeptor für die Hyaluronsäure, ursprünglich identifiziert in der Wand lymphatischer Gewebe (Banerji *et al.*, 1999), wird aber auch in SEZ der Leber exprimiert (Mouta Carreira *et al.*, 2001). Die genaue Rolle von *Lyve1* im Hyaluronsäuremetabolismus ist noch nicht aufgeklärt, allerdings ist bekannt, dass *Lyve1* Hyaluronsäure im lymphatischen Gewebe bindet und ihre Internalisierung fördert. Eine ähnliche Funktion könnte *Lyve1* auch in der Leber haben. Die Hyaluronsäure ist an der positiven Regulation der Zellmigration beteiligt (Prevo *et al.*, 2001). Es wäre möglich, dass Zellen der Leber (SEZ und HSZ) die Hyaluronsäure über *Lyve1* aufnehmen, sie aus dem Kreislauf entfernen und so einen antimigrativen Effekt vermitteln.

Robo4 ist vor allem für seine Expression in hämatopoetischen Stammzellen bekannt, die Expression nimmt dort mit zunehmender Differenzierung ab (Smith-Berdan *et al.*, 2011). Die Aufgabe von Robo4 in diesen Zellen ist die Erhaltung der Stammzellen in ihrer Nische, denn ein *Knockdown* von Robo4 führt zu einer Delokalisierung der hämatopoetischen Stammzellen. Diese sind dann vermehrt in der Peripherie und nicht in ihrer Nische, dem Knochenmark, nachzuweisen (Smith-Berdan *et al.*, 2011). Diese Aufgabe erfüllt Robo4 in Kooperation mit CXCR4, ein Rezeptor, der ebenfalls von ruhenden HSZ exprimiert wird und wichtig ist für die Interaktion von SEZ und HSZ im Disseschen Raum (Sawitza *et al.*, 2009; Smith-Berdan *et al.*, 2011). Die stark verminderte Robo4-Expression während der HSZ-Aktivierung könnte dazu führen, dass die HSZ ihre Lokalisation in der Nische aufgeben. Liganden für die Robo-Proteine sind die sogenannten Slit-Proteine, die Interaktion zwischen Slit2 und Robo1 ist für eine positive Regulation der Zellmigration verantwortlich, wohingegen Robo4 einen inhibierenden Einfluss hat. Dabei ist bisher noch unsicher, ob Slit2 auch von Robo4 gebunden wird (Enomoto *et al.*, 2016). Während der HSZ-Aktivierung zeigte sich im Expressionsarray eine gleichbleibende Robo1-Expression und eine leicht erhöhte Slit2-Expression (Arraydaten sind in der Datenbank *ArrayExpress* einsehbar, siehe Kapitel 3.3.1). Eventuell wird Robo1 nicht über die Genexpression, sondern mittels anderer Mechanismen in seiner Aktivität reguliert. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von Robo4 über Promotermethylierung reguliert werden kann (Okada *et al.*, 2014), dies wurde in dieser Arbeit auch für die HSZ-Aktivierung nachgewiesen.

Um eine erhöhte Migration zu realisieren, müssen auch Veränderungen des Cytoskeletts erfolgen, beispielsweise eine Polarisierung der Zellen. Diese Aufgabe könnte in der aktivierenden HSZ Septin 5 übernehmen, dass verstärkt exprimiert wird (Arraydaten sind in der Datenbank *ArrayExpress* einsehbar, siehe Kapitel 3.3.1). Septin5 ist ein GTPase des Cytoskeletts (Dent *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren gezeigt, dass die Sulfatase Sulf2 während der HSZ-Aktivierung epigenetisch reguliert und verstärkt exprimiert wird (siehe Abbildung 17, M+N). Die zunehmende Sulf2-Expression ist bereits aus der Gewebsregeneration nach Leberschädigung bekannt, zudem wurde schon gezeigt, dass Sulf2 einen promigrativen Effekt hat (Graham *et al.*, 2016). An dieser Stelle zeigt sich sehr schön, dass während der HSZ-Aktivierung antimigrative Proteine vermindert und Proteine mit einem positiven Einfluss auf die Migration verstärkt exprimiert werden.

Neben der Regulation der Zellmigration ist auch die Regulation der Proliferation ein wichtiger Prozess in aktivierenden HSZ. Einige Gene, deren Produkte einen antiproliferativen Effekt haben, werden an späteren Tagen der Aktivierung vermindert exprimiert. Lhx6 gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle in vielen Entwicklungsprozessen spielen. Das entsprechende Gen ist in vielen Tumorarten hypermethyliert und hat einen antiproliferativen und zusätzlich auch einen antimigrativen Effekt (Liu *et al.*, 2013). Die verminderte Expression von Lhx6 im Verlauf der HSZ-

Aktivierung legt die Vermutung nahe, dass die Proliferation in ruhenden HSZ unterdrückt ist. Außerdem wird deutlich, dass einige der differentiell exprimierten Genprodukte mehrere Funktionen in der Regulation der HSZ-Homöostase übernehmen. Dies gilt nicht nur für Lhx6, sondern auch für die miRNA126, die zusätzlich zu ihrer antimigrativen auch eine antiproliferative Wirkung hat (Guo *et al.*, 2013).

Eine epigenetische Regulation und verstärkte Expression erfuhr auch das Protein Wt1 (Abbildung 15), welches vor allem als Tumorsuppressorgen mit gestörter Expression in kindlichen Nierentumoren bekannt ist (Haber *et al.*, 1990). Die verstärkte Expression von Wt1 während der HSZ-Aktivierung weist darauf hin, dass die HSZ durch den Aktivierungsprozess in einen ursprünglicheren, potenteren Zustand zurückkehren. HSZ entstehen während der Embryogenese in der Maus aus Wt1-positiven Zellen, die aus dem *Septum transversum* in die Leber einwandern (Asahina *et al.*, 2011), zudem ist Wt1 essentiell für die Entwicklung der Leber (Ijpenberg *et al.*, 2007). Ruhende HSZ exprimierten in den hier beschriebenen Experimenten kein Wt1, die Expression kehrt erst im aktivierten Zustand zurück, dies unterstützt die Theorie, dass HSZ potentielle adulte Stammzellen sind, die einige Stammzeleigenschaften erst durch den Aktivierungsprozess erhalten. Eine funktionelle Erklärung für die Wt1-Hochregulation liefert die Erkenntnis, dass Wt1 Tet2 binden kann und an Wt1-Zielgene rekrutiert, um deren DNA-Demethylierung und Expressionsaktivierung zu vermitteln (Wang *et al.*, 2015). Da während der HSZ-Aktivierung eine starke globale DNA-Demethylierung auftrat, ist es möglich, dass Wt1 an der Initiation dieses Prozesses beteiligt ist.

Neben dem Einfluss auf Migration und Proliferation wurden auch viele Gene epigenetisch reguliert, für die eine Beteiligung an Differenzierungsprozessen bekannt ist. Hierzu gehören Cnr2 (siehe Abbildung 16, A+B), Klf2 (siehe Abbildung 17, G+H) und Bmp4 (siehe Abbildung 17, C+D), aber auch Gene, die am Wnt- und am Notch-Signalweg beteiligt sind.

Erst kürzlich wurde entdeckt, dass sowohl der Cannabinoidrezeptor 1 als auch 2 für die Entwicklung der Leber wichtig sind (Liu *et al.*, 2016). Diese Abhängigkeit zeigt sich in kleineren Lebern und verminderter Gallengangsbildung in KO-Tieren, die zurückzuführen sind auf eine verminderte Zellproliferation und eine gestörte Physiologie der Leber (Liu *et al.*, 2016). Als zugrundeliegende Ursache wurde ein deregulierter Methionin-Metabolismus aufgeführt, der u.a. zu einem reduzierten Gehalt an SAM führt. Dies kann zur Ausbildung von Steatosen führen, könnte allerdings auch einen Einfluss auf die DNA-Methylierung haben, da SAM in diesem Prozess ein wichtiger Methylgruppdonor ist. Während der HSZ-Aktivierung wurde Cnr2 verstärkt exprimiert, während der Expressionsarray nur eine sehr geringe Cnr1-Expression nachwies, die sich während der HSZ-Aktivierung nicht veränderte. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit den Erkenntnissen von Liu *et al.*, die besagen, dass Cnr2 in nicht-parenchymalen Zellen, Cnr1 hingegen in den Hepatozyten exprimiert wird

(Liu *et al.*, 2016). Die starke Expression von Cnr2 in aktivierten gegenüber ruhenden HSZ ist schon länger bekannt (Julien *et al.*, 2005). Die Aktivierung des Rezeptors wirkt in Abhängigkeit von der Ligandenmenge wachstumsinhibierend und apoptosefördernd, daraus ergibt sich eine antifibrotische Wirkung der Cnr2-Signalgebung (Julien *et al.*, 2005).

Klf2 wurde in embryonalen Stammzellen der Maus, neben Klf4 und 5 als potentester Faktor für den Erhalt des undifferenzierten Zustands charakterisiert. Außerdem ist Klf2 an der Reprogrammierung während der Herstellung von iPSZ beteiligt (Hall *et al.*, 2009; Jeon *et al.*, 2016) und wird im Verlauf von Differenzierungsprozessen sehr schnell in seiner Expression reduziert (Bruce *et al.*, 2007). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass Bmp4 die Selbstreplikation durch die Induktion von Klf2 über den Mek5/Erk5-Signalweg fördert (Morikawa *et al.*, 2016), allerdings wurden Bmp4 und Klf2 während der HSZ-Aktivierung gegensätzlich reguliert. Eine mögliche Erklärung ist, dass Bmp4 auch Klf4 induzieren kann, dies geschieht allerdings über einen anderen Signalweg, den Stat3-Signalweg (Hall *et al.*, 2009). Durch unterschiedliche Signalwege könnte somit die Bmp4-Wirkung moduliert werden. Im Gegensatz zu Klf2 wurde Klf4 in den von uns durchgeführten Expressionsarrays wie Bmp4, während der HSZ-Aktivierung verstärkt exprimiert. Klf2 ist allerdings nicht nur im Kontext der Stammzellbiologie bekannt, sondern besitzt auch eine Funktion im Rahmen der HSZ-Aktivierung. So wurde gezeigt, dass die Klf2-Expression durch SEZ den ruhenden Zustand der HSZ induziert und so auch eine antifibrotische Funktion erfüllt (Marrone *et al.*, 2015; Marrone *et al.*, 2013). Die vorliegende Arbeit liefert die neue Information, dass ruhende HSZ diesen Faktor auch selbst exprimieren, der dann wahrscheinlich autokrin oder parakrin den ruhenden Zustand der HSZ-Population erhalten könnte. Die Signalwege, über die Klf2 in HSZ potentiell für den Erhalt der Pluripotenz und des ruhenden Zustands sorgt, müssen noch genauer untersucht werden, dabei sollte auch berücksichtigt werden, welche Rolle Bmp4 in diesem Zusammenhang spielt. Während in der zuvor genannten Studie darauf hingewiesen wurde, dass Bmp4 die Selbstreplikation erhält (Morikawa *et al.*, 2016), weist eine weitere Studie darauf hin, dass Bmp4 während der HSZ-Aktivierung vermehrt exprimiert wird und zu einer Erhöhung der  $\alpha$ SMA-Expression führt (Fan *et al.*, 2006). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Bmp4 in der Stammzellbiologie eine duale Rolle spielt und seine Wirkung kontextabhängig ist. Die Familie der Bmp-Proteine ist an diversen Entwicklungsprozessen beteiligt, Bmp4 wird beispielsweise eingesetzt, um embryonale Stammzellen zu funktionellen Hepatozyten zu differenzieren (Gouon-Evans *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2007). Die verstärkte Expression von Bmp4 während der HSZ-Aktivierung könnte also als Zeichen einer beginnenden Differenzierung als Beitrag zur Leberregeneration gewertet werden. Außerdem könnte eine Verbindung zwischen Bmp4 und dem entwicklungsassoziierten Notch-Signalweg bestehen, denn in der Embryonalentwicklung von Vögeln konnte gezeigt werden, dass Deltex, ein Regulator des Notch-Signalwegs, für die Expression von Bmp4 benötigt wird (Endo *et al.*, 2003). Sowohl Deltex4 (siehe

Abbildung 14), als auch Bmp4 werden während der HSZ-Aktivierung epigenetisch reguliert und verstärkt exprimiert.

Der Notch-Signalweg ist ein zentraler und hochkonservierter Signalweg, der ein großes Spektrum an Entwicklungsprozessen reguliert. Die Signalgebung erfolgt über membranständige Notch-Rezeptoren und ebenfalls membranständige Delta- oder Jagged-Liganden auf der gleichen oder auf benachbarten Zellen, daher spricht man bei der Notch-Signalgebung auch von einer lateralen Spezifikation. Bei einer Rezeptoraktivierung wird die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors abgespalten, diese transloziert in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktor die Expression von Zielgenen reguliert. Neben der Beteiligung an zahlreichen Entwicklungsprozessen sind Notch-Rezeptoren auch an der Inhibition der Apoptose und der Induktion von Proliferation beteiligt (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999). Die Wirkung des Notch-Signalwegs ist sehr stark abhängig vom Kontext und von interagierenden Faktoren, daher ist die Notch-Signalgebung weniger als linearer Signalweg, sondern unter Einbeziehung des gesamten Signalnetzwerks einer Zelle zu sehen (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1999).

In Säugern werden vier verschiedene Notch-Rezeptoren, Notch 1-4, unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese in aktivierenden HSZ unterschiedlich exprimiert werden. Während die Expression von Notch2 keine Regulation erfuhr, wurden Notch1 und 4 stark vermindert exprimiert, Notch3 hingegen wurde im Verlauf der Aktivierung verstärkt exprimiert (siehe Abbildung 18). Es fand also während der HSZ-Aktivierung ein Wechsel in der Notch-Signalgebung statt, der wahrscheinlich funktionell wichtig für diesen Prozess ist. Die vier Notch-Rezeptoren scheinen unterschiedliche Funktionen zu haben (Ortica *et al.*, 2014), die auch während der Leberentwicklung deutlich werden. So wurde festgestellt, dass Notch1 in Leberprogenitorzellen aktiv ist, dieser Signalweg aber während der Differenzierung abgeschaltet wird (Ortica *et al.*, 2014). Dies konnte auch für den Aktivierungsprozess in HSZ gezeigt werden, denn Notch1 wurde im Verlauf erstens sehr stark in seiner Expression minimiert, was sowohl auf mRNA-Ebene und Proteinebene gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 18, A, B, C) und frühere Befunde bestätigte (Sawitza *et al.*, 2009). Zweitens war auch die Expression von Zielgenen entsprechend verändert (siehe Abbildung 18, E+F). Darüber hinaus sind die Rezeptoren Notch 1, 2 und 4 proliferationsfördernd, wohingegen Notch3 die Proliferation hemmt und die Differenzierung von Progenitorzellen in Hepatozyten unterstützt (Ortica *et al.*, 2014). Für die HSZ bedeutet dies, dass der Aktivierungsprozess für das Schicksal der Zellen einen entscheidenden Moment darstellt, in dem die Zelle durch die Veränderung in ihrer Ausstattung an Notch-Rezeptoren die Proliferation verhindert und vermutlich eine Differenzierung vorbereitet. Wie bereits weiter oben erwähnt, ist die Wirkung von Notch sehr vielseitig und daher abhängig von interagierenden Faktoren. Ein wichtiger Interaktionspartner von Notch-Rezeptoren, der während der HSZ-Aktivierung epigenetisch reguliert und verstärkt exprimiert wird, ist Deltex. Die Funktion und Bedeutung von

Deltex ist vor allem in *Drosophila melanogaster* untersucht worden, die nur ein Deltex-Protein besitzen, Säuger weisen hingegen fünf Deltex-Proteine auf (Obiero *et al.*, 2012; Busseau *et al.*, 1994). Deltex kann sowohl als negativer als auch als positiver Regulator des Notch-Signalwegs fungieren. So wurde für *Drosophila melanogaster* gezeigt, dass die Proteine Deltex, Kurtz und Notch in intrazellulären Vesikeln kolokalisieren und eine Deltex- und Kurtz-abhängige Polyubiquitylierung zu einem proteosomalen Abbau von Notch und damit einer Inhibition des Signalwegs führen (Mukherjee *et al.*, 2005). Kurtz ist homolog zu  $\beta$ -Arrestin der Säuger (Roman *et al.*, 2000). Sowohl der DNA-Methylierungsarray als auch die Genexpressionsarrays zeigten, dass  $\beta$ -Arrestin2 während der HSZ-Aktivierung epigenetisch reguliert und verstärkt exprimiert wurde (Arraydaten sind in der Datenbank *ArrayExpress* einsehbar, siehe Kapitel 3.3.1). Hori *et al.*, haben einen weiteren negativen Regulator von Notch identifiziert, Shrub als Bestandteil des endosomalen Sortierungskomplexes ESCRT-III (Hori *et al.*, 2011). Dadurch wird das Bild der Notch-Regulation erweitert, Notch wird in Anwesenheit von Kurtz und Shrub polyubiquityliert und degradiert, wohingegen die alleinige Interaktion von Notch mit Deltex zu einer Monoubiquitylierung und damit zu einer Liganden-unabhängigen intrazellulären Notch-Signalgebung führt (Hori *et al.*, 2004; Hori *et al.*, 2011). Diese Erkenntnis ermöglicht auch die Integration ursprünglich widersprüchlicher Daten die besagen, dass Deltex ein positiver Regulator des Notch-Signalwegs ist. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Notch mit dem *Suppressor of Hairy Wings* (Su(H)) interagiert und diesen so im Zytoplasma zurückhält. Die Interaktion von Notch mit Deltex führt zu einer Freilassung von Su(H) und einer Translokation in den Kern (Matsuno *et al.*, 1995). Für die Funktion von Deltex4 während der HSZ-Aktivierung ist nun wichtig festzustellen, mit welchen Notch-Rezeptoren es interagiert und ob auch Interaktionen mit weiteren Kofaktoren, wie  $\beta$ -Arrestin oder Komponenten des ESCRTIII-Komplexes, vorliegen. Diese könnten in weiteren Versuchen über eine Immunpräzipitation und anschließende massenspektrometrische Analyse des Präzipitats identifiziert und dann weiter charakterisiert werden.

Der Notch-Signalweg interagiert mit einem weiteren, für Entwicklungsprozesse sehr wichtigen Signalweg, dem Wnt-Signalweg, für den bereits starke Veränderungen während der HSZ-Aktivierung publiziert wurden (Kordes *et al.*, 2008), welche auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnten. Man unterscheidet den  $\beta$ -Catenin-abhängigen, kanonischen von  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwegen (Nusse, 2012). Es existieren verschiedene Wege, über die Notch- und Wnt-Signalgebung sich gegenseitig beeinflussen. Zum einen können sie miteinander kooperieren, indem beispielsweise die intrazelluläre Domäne von Notch und  $\beta$ -Catenin im Rahmen der Angiogenese gemeinsam einen transaktivierenden Komplex bilden (Yamamizu *et al.*, 2010). Des Weiteren können die Zielgene des einen Signalwegs den anderen Signalweg beeinflussen. Am Beispiel der Differenzierung von Stammzellen der weiblichen Brust wurde gezeigt, wie die beiden Wege miteinander interagieren, um das Gleichgewicht zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung zu



kontrollieren. In diesen Zellen sorgt der  $\beta$ -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg dafür, dass die Notch3-Expression durch Pygo2 gehemmt und dadurch eine Differenzierung unterdrückt wird (Gu *et al.*, 2013). Außerdem ist eine direkte molekulare Interaktion möglich, so kann Notch in Stammzellen aktives  $\beta$ -Catenin über Bindung inhibieren und so das Wnt-Signal regulieren und Entwicklungsentscheidungen präzisieren (Kwon *et al.*, 2011).

Wie der Notch-Signalweg zeigen auch Wnt-vermittelte Signalwege während der HSZ-Aktivierung eine starke Veränderung (Kordes *et al.*, 2008; Corbett *et al.*, 2015). Während in ruhenden Sternzellen der  $\beta$ -Catenin-abhängige kanonische Wnt-Signalweg aktiv ist, führt die Aktivierung zu einer verstärkten Aktivität von  $\beta$ -Catenin-unabhängigen Wnt-Signalwegen. Dies könnte unter anderem durch eine verstärkte Expression von Cxhc5 (siehe Abbildung 17, E+F) und APC2 (siehe Abbildung 17, A+B) als Inhibitor des  $\beta$ -Catenin-abhängige Wnt-Signalwegs (Kim *et al.*, 2010) bzw. Bestandteil des  $\beta$ -Catenin-Abbaukomplexes (Munemitsu *et al.*, 1995; Roberts *et al.*, 2011) bedingt worden sein. Auch die während der HSZ-Aktivierung ansteigende Expression von Wnt5a (siehe Abbildung 17, O+P), einem Liganden zur Vermittlung  $\beta$ -Catenin-unabhängiger Wnt-Signalwege, weist auf eine wesentliche Veränderung in der Wnt-Signalgebung hin. Auch Wt1, das im Rahmen der HSZ-Aktivierung verstärkt exprimiert wurde, wird als negativer Regulator des  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalwegs diskutiert (Kim *et al.*, 2010). Die HSZ-Aktivierung kann durch den Einsatz von Glykogen Synthase Kinase 3 beta-Inhibitoren verhindert werden, sodass davon auszugehen ist, dass HSZ die  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalgebung benötigen, um den ruhenden Zustand aufrechtzuerhalten (Kordes *et al.*, 2008, Corbett *et al.*, 2015). Obwohl ein verstärkter  $\beta$ -Catenin-abhängiger Wnt-Signalweg mit einem erhöhten Auftreten von fibrotischen Ereignissen in Verbindung gebracht wird (Cheon *et al.*, 2002), gibt es Studien, die zeigen, dass der aktive  $\beta$ -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg für die Erhaltung der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen wichtig ist und während der Differenzierung inaktiviert wird (Sato *et al.*, 2004). Dies könnte erklären, warum HSZ im ruhenden Zustand einen aktiven  $\beta$ -Catenin-abhängigen Wnt-Signalweg aufweisen, der wahrscheinlich zur Erhaltung dieses Zustands beiträgt (Sawitza *et al.*, 2009).

Wie bereits ausgeführt, war eine Vielzahl von Genen aus dem Notch- und den Wnt-Signalwegen von einer epigenetischen Regulation betroffen. Zahlreiche Studien zeigen, dass ein kompliziertes Zusammenspiel zwischen den beiden Signalwegen das Schicksal von Stammzellen in verschiedenen Kontexten bestimmt. In beiden Signalwegen war während der HSZ-Aktivierung eine bedeutende Veränderung nachzuweisen, sodass davon auszugehen ist, dass diese Signalwege essenziell für das Schicksal der aktivierenden HSZ sind und ihr Entwicklungsweg analog zu anderen Stammzellen kontrolliert wird.

## 5.5 Abschließende Beurteilung und weiterführende Experimente

Es lässt sich festhalten, dass HSZ während der Aktivierung eine bemerkenswerte Dynamik in der DNA-Methylierung und der Genexpression aufweisen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Aktivierung einen sehr wichtigen Prozess für die HSZ darstellt, der ihr Verhalten stark ändert und mit dem Erlangen neuer Eigenschaften und Funktionen verbunden ist. Dabei erinnert die HSZ-Aktivierung an die epigenetische Reprogrammierung, die aus der frühen Embryonalentwicklung bekannt ist. Der aktive Prozess der DNA-Demethylierung, der DNA-Reparaturmechanismen beinhaltet, findet vermutlich zum Großteil in nicht-kodierenden Bereichen statt, da für die kodierenden Bereiche vermehrt Hypermethylierungen nachgewiesen wurden. Die Lokalisation der DNA-Hypomethylierung ist nicht abschließend geklärt, allerdings konnte für die hier analysierten repetitive Elemente kein veränderter DNA-Methylierungsstatus während der HSZ-Aktivierung nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Promotermethylierung und Genexpression negativ miteinander korrelieren, die positive Korrelation zwischen Genkörpermethylierung und Genexpression konnte für einzelne Gene bestätigt werden. Gene mit gleichzeitiger Veränderung in DNA-Methylierung und Expression beeinflussen biologische Funktionen, die mit der HSZ-Aktivierung assoziiert sind, allerdings unterlagen auch zahlreiche Gene, die an Differenzierungsprozessen beteiligt sind einer starken epigenetischen Regulation. Auch die genspezifischen Analysen wiesen viele Gene nach, die an der Regulation von Migration, Pluripotenz und Differenzierung beteiligt sind. Sowohl dem Wnt- als auch dem Notch-Signalweg kommen während der HSZ-Aktivierung zentrale Bedeutungen zu, denn in beiden Signalwegen kam es zu funktionellen Veränderungen der Signalgebung, die sich in epigenetischen Veränderungen assoziierter Gene manifestierten.

Zusammengenommen unterstützen alle Ergebnisse die Sichtweise, dass es sich bei der HSZ um eine ruhende adulte Stammzelle handelt, die im Aktivierungsprozess viele Ähnlichkeiten mit etablierten Stammzellen aufweist.

Weiterführende Experimente sind zum einen notwendig, um den Prozess der aktiven DNA-Demethylierung weiter zu charakterisieren. Da verschiedene Theorien zur Katalyse dieses Vorgangs existieren und der gewählte Mechanismus stark kontextabhängig zu sein scheint, wäre es interessant zu erfahren, welche Enzyme während der HSZ-Aktivierung für die DNA-Demethylierung benötigt werden und ob alternative Reaktionswege bestehen. Des Weiteren bleibt die Klärung der Frage, in welchem Bereich des Genoms die detektierte starke DNA-Demethylierung auftritt. Ferner können die in der Arbeit identifizierten und während der HSZ-Aktivierung epigenetisch regulierten Gene in weiterführenden Experimenten funktionell charakterisiert werden, um ihre Bedeutung für ruhende oder aktivierte HSZ zu klären.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aran, D., Sabato, S. & Hellman, A.** (2013): DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome Biol*, 14. R21. doi: 10.1186/gb-2013-14-3-r21.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J.** (1999): Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, 284. 770-776.
- Asahina, K., Zhou, B., Pu, W. T. & Tsukamoto, H.** (2011): Septum transversum-derived mesothelium gives rise to hepatic stellate cells and perivascular mesenchymal cells in developing mouse liver. *Hepatology*, 53. 983-995.
- Banerji, S., Ni, J., Wang, S. X., Clasper, S., Su, J., Tammi, R. & Jackson, D. G.** (1999): LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*, 144. 789-801.
- Beraldi, R., Pittoggi, C., Sciamanna, I., Mattei, E. & Spadafora, C.** (2006): Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev*, 73. 279-287.
- Bian, E. B., Huang, C., Ma, T. T., Tao, H., Zhang, H., Cheng, C. & Li, J.** (2012): DNMT1-mediated PTEN hypermethylation confers hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 264. 13-22.
- Bian, E. B., Huang, C., Wang, H., Chen, X. X., Zhang, L., Lv, X. W. & Li, J.** (2014): Repression of Smad7 mediated by DNMT1 determines hepatic stellate cell activation and liver fibrosis in rats. *Toxicol Lett*, 224. 175-185.
- Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J. & Macleod, D.** (1985): A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell*, 40. 91-99.
- Bogdanović, O., Smits, A. H., de la Calle Mustienes, E., Tena, J. J., Ford, E., Williams, R. & Lister, R.** (2016): Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet*, 48. 417-426.
- Bradford, M. M.** (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72. 248-254.
- Brown, S. E., Suderman, M. J., Hallett, M. & Szyf, M.** (2008): DNA demethylation induced by the methyl-CpG-binding domain protein MBD3. *Gene*, 420. 99-106.
- Bruce, S. J., Gardiner, B. B., Burke, L. J., Gongora, M. M., Grimmond, S. M. & Perkins, A. C.** (2007): Dynamic transcription programs during ES cell differentiation towards mesoderm in serum versus serum-free BMP4 culture. *BMC Genomics*, 8. 365.
- Busseau, I., Diederich, R. J., Xu, T. & Artavanis-Tsakonas, S.** (1994): A member of the Notch group of interacting loci, *deltex* encodes a cytoplasmic basic protein. *Genetics*, 136. 585-596.

- Castilho-Fernandes, A., de Almeida, D. C., Fontes, A. M., Melo, F. U., Picanco-Castro, V., Freitas, M. C. & Covas, D. T.** (2011): Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Mol Pathol*, 91. 664-672.
- Cheng, X.** (1995): DNA modification by methyltransferases. *Curr Opin Struct Biol*, 5. 4-10.
- Cheng, X. & Blumenthal, R.M.** (2010): Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. *Biochemistry*, 49. 2999-3008.
- Cheon, S. S., Cheah, A. Y., Turley, S., Nadesan, P., Poon, R., Clevers, H. & Alman, B. A.** (2002):  $\beta$ -catenin stabilization dysregulates mesenchymal cell proliferation, motility, and invasiveness and causes aggressive fibromatosis and hyperplastic cutaneous wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99. 6973-6978.
- Chuang, J. C. & Jones, P. A.** (2007): Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*, 61. 24r-29r.
- Coll, M., Taghdouini, A. E., Perea, L., Mannaerts, I., Vila-Casadesus, M., Blaya, D. & Sancho-Bru, P.** (2015): Integrative miRNA and Gene Expression Profiling Analysis of Human Quiescent Hepatic Stellate Cells. *Sci Rep*, 5. 11549.
- Corbett, L., Mann, J. & Mann, D. A.** (2015): Non-canonical Wnt predominates in activated rat hepatic stellate cells, influencing HSC survival and paracrine stimulation of Kupffer cells. *PLoS One*, 10. e0142794.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A. & Bellacosa, A.** (2011): Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell*, 146. 67-79.
- Cross, S. H., Charlton, J. A., Nan, X. & Bird, A. P.** (1994): Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet*, 6. 236-244.
- Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N. & Lapidot, T.** (2005): Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nat Immunol*, 6. 1038-1046.
- Dent, J., Kato, K., Peng, X. R., Martinez, C., Cattaneo, M., Poujol, C., Nurden, P., Trimbe, W. S. & Ware, J.** (2002): A prototypic platelet septin and its participation in secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99. 3064-3069.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Müller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J. & Horwitz, E.** (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8. 315-317.
- Drohatsch, A. C. & Coey, C. T.** (2016): Role of Base Excision "Repair" Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chem Rev*. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00191

- Duncan, B. K. & Miller, J. H.** (1980): Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*, 287. 560-561.
- Ehrlich, M.** (2002): DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 21. 5400-5413.
- El Taghdouini, A., Sorensen, A. L., Reiner, A. H., Coll, M., Verhulst, S., Mannaerts, I. & van Grunsven, L. A.** (2015): Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression patterns in purified, uncultured human liver cells and activated hepatic stellate cells. *Oncotarget*, 6. 26729-26745.
- Endo, Y., Osumi, N. & Wakamatsu, Y.** (2003): Deltex/Dtx mediates NOTCH signaling in regulation of Bmp4 expression in cranial neural crest formation during avian development. *Dev Growth Differ*, 45. 241-248.
- Enomoto, S., Mitsui, K., Kawamura, T., Iwanari, H., Daigo, K., Horiuchi, K. & Hamakubo, T.** (2016): Suppression of Slit2/Robo1 mediated HUVEC migration by Robo4. *Biochem Biophys Res Commun*, 469. 797-802.
- Fan, J., Shen, H., Sun, Y., Li, P., Burczynski, F., Namaka, M. & Gong, Y.** (2006): Bone morphogenetic protein 4 mediates bile duct ligation induced liver fibrosis through activation of Smad1 and ERK1/2 in rat hepatic stellate cells. *J Cell Physiol*, 207. 499-505.
- Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S. & Jeltsch, A.** (2001): The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol*, 309. 1189-1199.
- Ferguson-Smith, A. C., Cattanach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V. & Surani, M. A.** (1991): Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature*, 351. 667-670.
- Ferrero, M., Desiderio, M.A., Martinotti, A., Melani, C., Bernelli-Zazzeta, A., Colombo, M. P. & Cairo, G.** (1994): Expression of a growth arrest specific gene (gas-6) during liver regeneration: molecular mechanisms and signalling pathways. *J Cell Physiol*, 158. 263-296.
- Friedman, S. L., Roll, F. J., Boyles, J. & Bissell, D. M.** (1985): Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82. 8681-8685.
- Friedman, S. L.** (2003): Liver fibrosis-from bench to bedside. *J Hepatol*, 38. 38-53.
- Friedman, S. L.** (2008): Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88. 125-172.
- Fuchs, E., Tumber, T. & Guasch, G.** (2004): Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 116. 769-778.

- Gaca, M. D., Zhou, X., Issa, R., Kiriella, K., Iredale, J. P. & Benyon, R. C.** (2003): Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol*, 22. 229-239.
- Gama-Sosa, M. A., Slagel, V. A., Trewyn, R. W., Oxenhandler, R., Kuo, K. C., Gehrke, C. W. & Ehrlich, M.** (1983): The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 11. 6883-6894.
- Gard, A. L., White, F. P. & Dutton, G. R.** (1985): Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol*, 8. 359-375.
- Geerts, A., Vrijssen, R., Rauterberg, J., Burt, A., Schellinck, P. & Wisse, E.** (1989): In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol*, 9. 59-68.
- Gong, X. H., Chen, C., Hou, P., Zhu, S. C., Wu, C. Q., Song, C. L. & Zhu, L.** (2014): Overexpression of miR-126 inhibits the activation and migration of HSCs through targeting CRK. *Cell Physiol Biochem*, 33. 97-106.
- Götze, S., Schumacher, E.C., Kordes, C., Häussinger, D.** (2015): Epigenetic changes during hepatic stellate cell activation. *PLoS One*, 10. e0128745.
- Gouon-Evans, V., Boussemart, L., Gadue, P., Nierhoff, D., Koehler, C. I., Kubo, A. & Keller, G.** (2006): BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm. *Nat Biotechnol*, 24. 1402-1411.
- Goyal, R., Reinhardt, R. & Jeltsch, A.** (2006): Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 34. 1182-1188.
- Graham, K., Murphy, J. I. & Dhoot, G. K.** (2016): SULF1/SULF2 reactivation during liver damage and tumour growth. *Histochem Cell Biol*, 146. 85-97.
- Gu, X., Lu, C., He, D., Ly, C., Jin, J., Liu, D. & Mo, X.** (2016): Notch3 negatively regulates chemoresistance in breast cancers. *Tumour Biol*, 37. 15825-15833.
- Gu, B., Watanabe, K., Sun, P., Fallahi, M. & Dai, X.** (2013): Chromatin effector Pygo2 mediates Wnt-notch crosstalk to suppress luminal/alveolar potential of mammary stem and basal cells. *Cell Stem Cell*, 13. 48-61.
- Gu, T. P., Guo, F., Yang, H., Wu, H. P., Xu, G. F., Liu, W. & Xu, G. L.** (2011): The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature*, 477. 606-610.
- Guo, C. J., Pan, Q., Xiong, H., Qiao, Y. Q., Bian, Z. L., Zhong, W. & Fang, J. Y.** (2013): Dynamic expression of miR-126\* and its effects on proliferation and contraction of hepatic stellate cells. *FEBS Lett*, 587. 3792-3801.
- Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H. & Xu, G. L.** (2014): Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, 15. 447-458.

- Haber, D. A., Buckler, A. J., Glaser, T., Call, K. M., Pelletier, J., Sohn, R. L., Douglass, E. C. & Housman D. E.** (1990): An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilm's tumor. *Cell*, 61. 1257-1269.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W. & Surani, M. A.** (2002): Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, 117. 15-23.
- Hajkova, P., Jeffries, S. J., Lee, C., Miller, N., Jackson, S. P. & Surani, M. A.** (2010): Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. *Science*, 329. 78-82
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L. & Smith, A.** (2009): Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 5. 597-609.
- Hall, T. A.** (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41. 95-98.
- Hansen, R. S. & Gartler, S. M.** (1990): 5-Azacytidine-induced reactivation of the human X chromosome-linked PGK1 gene is associated with a large region of cytosine demethylation in the 5' CpG island. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87. 4174-4178.
- Häussinger, D. & Löffler, G.:** Leber-Zentrales Stoffwechselorgan. In: Heinrich, P.C., Müller, M., Graeve, L. Hrsg. Löffler/ Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Berlin; Springer; 2014. 770-783.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H. & Li, E.** (2002): Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129. 1983-1993.
- He, Y. F., Li, B. Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q. & Xu, G. L.** (2011): Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science*, 333. 1303-1307.
- Hendriks, H. F., Verhoofstad, W. A., Brouwer, A., de Leeuw, A. M. & Knook, D. L.** (1985): Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res*, 160. 138-149.
- Herman, J. G.** (1999): Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*, 9. 359-367.
- Hogan, B. L.** (1996): Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev*, 6. 432-438.
- Hori, K., Fostier, M., Ito, M., Fuwa, T. J., Go, M. J., Okano, H. & Matsuno, K.** (2004): Drosophila deltex mediates suppressor of Hairless-independent and late-endosomal activation of Notch signaling. *Development*, 131. 5527-5537.
- Hori, K., Sen, A., Kirchhausen, T. & Artavanis-Tsakonas, S.** (2011): Synergy between the ESCRT-III complex and Deltex defines a ligand-independent Notch signal. *J Cell Biol*, 195. 1005-1015.
- Hu, X., Zhang, L., Mao, S. Q., Li, Z., Chen, J., Zhang, R. R. & Xu, G. L.** (2014): Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14. 512-522.

- Hu, X. V., Rodrigues, T. M., Tao, H., Baker, R. K., Miraglio, L., Orth, A. P., Lyons, G. E., Schultz, P. G. & Wu, X.** (2010): Identification of RING finger protein 4 (RNF4) as a modulator of DNA demethylation through a functional genomics screen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107. 15087-15092.
- Huch, M. & Dollé, L.** (2016): The plastic cellular state of liver cell: Are EpCAM and Lgr5 fit for purpose? *Hepatology*, 64. 652-662.
- Ijpenberg, A., Perez-Pomares, J. M., Guadix, J. A., Carmona, R., Portillo-Sanchez, V., Macias, D. & Munoz-Chapuli, R.** (2007): Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis. *Dev Biol*, 312. 157-170.
- Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., Webb, S., Kerr, A. R., James, K. D., Turner, D. J. & Bird, A. P.** (2010): Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*, 6. e1001134. doi: 10.1371/journal.pgen.1001134.
- Inoue, A., Matoba, S. & Zhang, Y.** (2012): Transcriptional activation of transposable elements in mouse zygotes is independent of Tet3-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Cell Res*, 22. 1640-1649.
- Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C. & Zhang, Y.** (2010): Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*, 466. 1129-1133.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A. & Zhang, Y.** (2011): Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science*, 333. 1300-1303.
- Jarnagin, W. R., Rockey, D. C., Koteliansky, V. E., Wang, S. S. & Bissell, D. M.** (1994): Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol*, 127. 2037-2048.
- Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquie, O., Logeat, F., Strong, C. F., Brou, C., Seidah N. G. & Isra, I. A.** (1998): Delta-1 activation of Notch-1 signaling results in Hes1 transactivation. *Mol Cell Biol*, 18. 7423-7431.
- Jeon, H., Waku, T., Azami, T., Khoa le, T. P., Yanagisawa, J., Takahashi, S. & Ema, M.** (2016): Comprehensive Identification of Kruppel-Like Factor Family Members Contributing to the Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells and Cellular Reprogramming. *PLoS One*, 11. e0150715. doi: 10.1371/journal.pone.0150715
- Jones, P. A.** (1999): The DNA methylation paradox. *Trends Genet*, 15. 34-37.
- Julien, B., Grenard, P., Teixeira-Clerc, F., Van Nhieu, J. T., Li, L., Karsak, M. & Lotersztajn, S.** (2005): Antifibrogenic role of the cannabinoid receptor CB2 in the liver. *Gastroenterology*, 128. 742-755.



- Juttermann, R., Li, E. & Jaenisch, R.** (1994): Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91. 11797-11801.
- Katayama, Y., Battista M., Kao, W., Hidalgo, A., Peired, A. J., Thomas, S. A., Frenette P. S.** (2006): Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*, 124. 407-421.
- Kienhofer, S., Musheev, M. U., Stapf, U., Helm, M., Schomacher, L., Niehrs, C. & Schäfer, A.** (2015): GADD45a physically and functionally interacts with TET1. *Differentiation*, 90. 59-68.
- Kim, M. S., Yoon, S. K., Bollig, F., Kitagaki, J., Hur, W., Whye, N. J., Wu, Y. P., Rivera, M. N., Park, J. Y., Kim, H. S., Malik, K., Bell, D. W., Englert, C., Peratoni, A. O. & Lee, S. B.** (2010): A novel Wilms tumor target gene negatively regulates the Wnt signaling pathway. *J Biol Chem*, 285. 14585-14593.
- Klimasauskas, S., Kumar, S., Roberts, R. J. & Cheng, X.** (1994): HhaI methyltransferase flips its target base out of the DNA helix. *Cell*, 76. 357-369.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K. & Komatsu, K.** (2002): NSB1 localizes to gamma-H2AX foci through interaction with the FHA/BRCT domain. *Curr Biol*, 12. 1846-1851.
- Klingener, M., Chavali, M., Singh, J., McMillan, N., Coomes, A., Dempsey, P. J. & Aguirre, A.** (2014): N-cadherin promotes recruitment and migration of neural progenitor cells from the SVZ neural stem cell niche into demyelinated lesions. *J Neurosci*, 34. 9590-9606.
- Kordes, C., Sawitza, I., Müller-Marbach, A., Ale-Agha, N., Keitel, V., Klonowski-Stumpe, H. & Häussinger, D.** (2007): CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 352. 410-417.
- Kordes, C., Sawitza, I. & Haussinger, D.** (2008): Canonical Wnt signaling maintains the quiescent stage of hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 367. 116-123.
- Kordes, C., Häussinger, D.** (2013): Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest*, 123. 1874-1880.
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S. & Häussinger, D.** (2013): Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 31. 290-304.
- Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., Herebian, D. & Häussinger, D.** (2014): Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J Clin Invest*, 124. 5503-5515.
- Krampera, M., Franchini, M., Pizzolo, G. & Aprili, G.** (2007): Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood transfus*, 5. 120-129.
- Kupffer, C.** (1876): Ueber Sternzellen der Leber. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 12. 353-358.
- Kurimoto, K., Yamaji, M., Seki, Y. & Saitou, M.** (2008): Specification of the germ cell lineage in mice: a process orchestrated by the PR-domain proteins, Blimp1 and Prdm14. *Cell Cycle*, 7. 3514-3518.

- Kwon, C., Cheng, P., King, I. N., Andersen, P., Shenje, L., Nigam, V. & Srivastava, D.** (2011): Notch post-translationally regulates betacatenin protein in stem and progenitor cells. *Nat Cell Biol*, 13. 1244-1251.
- Laemmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227. 680-685.
- Lakner, A. M., Moore, C. C., Gullledge, A. A. & Schrum, L. W.** (2010): Daily genetic profiling indicates JAK/STAT signaling promotes early hepatic stellate cell transdifferentiation. *World J Gastroenterol*, 16. 5047-5056.
- Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsirigos, A., Ong, C. T. & Wei, C. L.** (2010): Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*, 20. 320-331.
- Leakey, T. I., Zielinski, J., Siegfried, R. N., Siegel, E. R., Fan, C. Y. & Cooney, C. A.** (2008): A simple algorithm for quantifying DNA methylation levels on multiple independent CpG sites in bisulfite genomic sequencing electropherograms. *Nucleic Acids Res*, 36. e64. doi: 10.1093/nar/gkn210
- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U. & Bestor, T. H.** (1992): A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, 71. 865-873.
- Li, Z., Gu, T. P., Weber, A. R., Shen, J. Z., Li, B. Z., Xie, Z. G. & Xu, G. L.** (2015): Gadd45a promotes DNA demethylation through TDG. *Nucleic Acids Res*, 43. 3986-3997.
- Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J. & Ecker, J. R.** (2009): Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462. 315-322.
- Liu, L. Y., Alexa, K., Cortes, M., Schatzman-Bone, S., Kim, A. J., Mukhopadhyay, B. & Goessling, W.** (2016): Cannabinoid receptor signaling regulates liver development and metabolism. *Development*, 143. 609-622.
- Liu, W. B., Jiang, X., Han, F., Li, Y. H., Chen, H. Q., Liu, Y. & Liu, J. Y.** (2013): LHX6 acts as a novel potential tumour suppressor with epigenetic inactivation in lung cancer. *Cell Death Dis*, 4, e882. doi: 10.1038/cddis.2013.366
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D.** (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25. 402-408.
- Lorenzon, E., Colladel, R., Andreuzzi, E., Marastoni, S., Todaro, F., Schiappacassi, M. & Mongiat, M.** (2012): MULTIMERIN2 impairs tumor angiogenesis and growth by interfering with VEGF-A/VEGFR2 pathway. *Oncogene*, 31. 3136-3147.
- Maher, J. J. & McGuire, R. F.** (1990): Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis in vivo. *J Clin Invest*, 86. 1641-1648.

- Maiti, A. & Drohat, A. C.** (2011): Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem*, 286. 35334-35338.
- Mann, J., Chu, D. C., Maxwell, A., Oakley, F., Zhu, N. L., Tsukamoto, H. & Mann, D. A.** (2010): MeCP2 controls an epigenetic pathway that promotes myofibroblast transdifferentiation and fibrosis. *Gastroenterology*, 138. 705-714.
- Mann, J., Oakley, F., Akiboye, F., Elsharkawy, A., Thorne, A. W. & Mann, D. A.** (2007): Regulation of myofibroblast transdifferentiation by DNA methylation and MeCP2: implications for wound healing and fibrogenesis. *Cell Death Differ*, 14. 275-285.
- Marrone, G., Maeso-Diaz, R., Garcia-Cardena, G., Abraldes, J. G., Garcia-Pagan, J. C., Bosch, J. & Gracia-Sancho, J.** (2015): KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins. *Gut*, 64. 1434-1443
- Marrone, G., Russo, L., Rosado, E., Hide, D., Garcia-Cardena, G., Garcia-Pagan, J. C. & Gracia-Sancho, J.** (2013): The transcription factor KLF2 mediates hepatic endothelial protection and paracrine endothelial-stellate cell deactivation induced by statins. *J Hepatol*, 58. 98-103.
- Matsuno, K., Diederich, R. J., Go, M. J., Blaumueller, C. M. & Artavanis-Tsakonas, S.** (1995): Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. *Development*, 121. 2633-2644.
- Matsuo, K., Silke, J., Georgiev, O., Marti, P., Giovannini, N. & Rungger, D.** (1998): An embryonic demethylation mechanism involving binding of transcription factors to replicating DNA. *Embo J*, 17. 1446-1453.
- Matsuoka, M., Pham, N. T. & Tsukamoto, H.** (1989): Differential effects of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta 1 on cell proliferation and collagen formation by cultured fat-storing cells. *Liver*, 9. 71-78.
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. & Haaf, T.** (2000): Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403. 501-502.
- Meissner, A., Gnirke, A., Bell, G. W., Ramsahoye, B., Lander, E. S. & Jaenisch, R.** (2005): Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 33. 5868-5877.
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P. & Meissner, A.** (2008): Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 454. 49-55.
- Moarefi, A. H. & Chedin, F.** (2011): ICF syndrome mutations cause a broad spectrum of biochemical defects in DNMT3B-mediated de novo DNA methylation. *J Mol Biol*, 409. 758-772.
- Mohandas, T., Sparkes, R. S. & Shapiro, L. J.** (1981): Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science*, 211. 393-396.

- Mondal, S., Subramanian, K. K., Sakai, J., Bajrami, B. & Luo, H. R.** (2012): Phosphoinositide lipid phosphatase SHIP1 and PTEN coordinate to regulate cell migration and adhesion. *Mol Biol Cell*, 23. 1219-1230.
- Morikawa, M., Koinuma, D., Mizutani, A., Kawasaki, N., Holmborn, K., Sundqvist, A. & Miyazono, K.** (2016): BMP Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal through Distinct Functions of Different Kruppel-like Factors. *Stem Cell Reports*, 6. 64-73.
- Mouta Carreira, C., Nasser, S. M., di Tomaso, E., Padera, T. P., Boucher, Y., Tomarev, S. I. & Jain, R. K.** (2001): LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res*, 61. 8079-8084.
- Moyzis, R. K., Torney, D. C., Meyne, J., Buckingham, J. M., Wu, J. R., Burks, C., Sirotkin, K. M. & Goad, W. B.** (1989): The distribution of interspersed repetitive DNA sequences in the human genome. *Genomics*, 4. 273-289.
- Mukherjee, A., Veraksa, A., Bauer, A., Rosse, C., Camonis, J. & Artavanis-Tsakonas, S.** (2005): Regulation of Notch signalling by non-visual beta-arrestin. *Nat Cell Biol*, 7. 1191-1201.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B. & Polakis, P.** (1995): Regulation of intracellular betacatenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92. 3046-3050.
- Murrell, A., Hesson, S., Bowden, L., Constancia, M., Dean, W., Kelsey, G. & Reik, W.** (2001): An intragenic methylated region in the imprinted Igf2 gene augments transcription. *EMBO Rep*, 2. 1101-1106.
- Nabetani, A., Koujin, T., Tsutsumi, C., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y.** (2001): A conserved protein, Nuf2, is implicated in connecting the centromere to the spindle during chromosome separation: a link between the kinetochore function and the spindle checkpoint. *Chromosoma*, 110. 332-334.
- Nieto, N., Friedman, S. L. & Cederbaum, A. I.** (2002): Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem*, 277. 9853-9864.
- Niki, T., De Bleser, P. J., Xu, G., Van Den Berg, K., Wisse, E. & Geerts, A.** (1996): Comparison of glial fibrillary acidic protein and desmin staining in normal and CCl4-induced fibrotic rat livers. *Hepatology*, 23. 1538-1545.
- Niki, T., Rombouts, K., De Bleser, P., De Smet, K., Rogiers, V., Schuppan, D. & Geerts, A.** (1999): A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology*, 29. 858-867.
- Nusse, R.** (2012): Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4. doi: 10.1101/cshperspect.a011163.

- Nyfelner, Y., Kirch, R. D., Mantei, N., Leone, D. P., Radtke, F., Suter, U. & Taylor, V.** (2005): Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal. *Embo J*, 24. 3504-3515
- Oakes, C. C., La Salle, S., Trasler, J. M. & Robaire, B.** (2009): Restriction digestion and real-time PCR (qAMP). *Methods Mol Biol*, 507. 271-280.
- Obiero, J., Walker, J. R. & Dhe-Paganon, S.** (2012): Fold of the conserved DTC domain in Deltex proteins. *Proteins*, 89. 1495-1499.
- Oda, H., Shimizu, S., Minami, K., Kaneko, K. & Ishikawa, T.** (1997): Loss of imprinting of the IGF2 gene in a Wilms' tumor in an adult. *J Natl Cancer Inst*, 89. 1813-1814.
- Okada, Y., Funahashi, N., Tanaka, T., Nishiyama, Y., Yuan, L., Shirakura, K. & Doi, T.** (2014): Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation of the proximal promoter. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34. 1531-1538.
- Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A. & Li, E.** (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99. 247-257.
- Ortica, S., Tarantino, N., Aulner, N., Israel, A. & Gupta-Rossi, N.** (2014): The 4 Notch receptors play distinct and antagonistic roles in the proliferation and hepatocytic differentiation of liver progenitors. *Faseb J*, 28. 603-614.
- Osorno, R., Tsakiridis, A., Wong, F., Cambray, N., Economou, C., Wilkie, R. & Wilson, V.** (2012): The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. *Development*, 139. 2288-2298.
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R. & Walter, J.** (2000): Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, 10. 475-478.
- Paik, Y. H., Schwabe, R. F., Bataller, R., Russo, M. P., Jobin, C. & Brenner, D. A.** (2003): Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology*, 37. 1043-1055.
- Perugorria, M. J., Wilson, C. L., Zeybel, M., Walsh, M., Amin, S., Robinson, S. & Mann, J.** (2012): Histone methyltransferase ASH1 orchestrates fibrogenic gene transcription during myofibroblast transdifferentiation. *Hepatology*, 56. 1129-1139.
- Pinney, S. E.** (2014): Mammalian Non-CpG Methylation: Stem Cells and Beyond. *Biology (Basel)*, 3. 739-751.
- Pisconti, A., Banks, G. B., Babaeijandaghi, F., Betta, N. D., Rossi, F. M., Chamberlain, J. S. & Olwin, B. B.** (2016): Loss of niche-satellite cell interactions in syndecan-3 null mice alters muscle progenitor cell homeostasis improving muscle regeneration. *Skelet Muscle*, 6. doi: 10.1186/s13395-016-0104-8.

- Piwko, W., Olma, M. H., Held, M., Bianco, J. N., Pedrioli, P. G., Hofmann, K., Pasero P., Gehrlich, D. W., & Peter, M.** (2010): RNAi-based screening identifies Mms22l-Nfkbil2 complex as a novel regulator of DNA replication in human cells. *Embo J*, 29. 4210-4222.
- Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M. & Reik, W.** (2010): Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463. 1101-1105.
- Prevo, R., Banerji, S., Ferguson, D. J., Clasper, S. & Jackson, D. G.** (2001): Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem*, 276. 19420-19430.
- Ramadori, G., Veit, T., Schwogler, S., Dienes, H. P., Knittel, T., Rieder, H. & Meyer zum Buschenfelde, K. H.** (1990): Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 59. 349-357.
- Ramani, K., Yang, H., Kuhlenkamp, J., Tomasi, L., Tsukamoto, H., Mato, J. M. & Lu, S. C.** (2010): Changes in the expression of methionine adenosyltransferase genes and S-adenosylmethionine homeostasis during hepatic stellate cell activation. *Hepatology*, 51. 986-995.
- Rasmussen, K. D. & Helin, K.** (2016): Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev*, 30. 733-750.
- Reister, S., Kordes, C., Sawitza, I. & Häussinger, D.** (2011): The epigenetic regulation of stem cell factors in hepatic stellate cells. *Stem Cells Dev*, 20. 1687-1699.
- Roberts, D. M., Pronobis, M. I., Poulton, J. S., Waldmann, J. D., Stephenson, E. M., Hanna, S. & Peifer, M.** (2011): Deconstructing the  $\beta$ catenin destruction complex: mechanistic roles for the tumor suppressor APC in regulating Wnt signaling. *Mol Biol Cell*, 22. 1845-1863.
- Robey, P.** (2017): "Mesenchymal stem cells": fact or fiction and implications in their therapeutical use. *F1000Res*, 6. doi: 10.12688/f1000research.10955.1.
- Rockey, D. C. & Weisiger, R. A.** (1996): Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: implications for regulation of portal pressure and resistance. *Hepatology*, 24. 233-240.
- Rogakou, E. P., Pich, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M.** (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serin 139. *J Biol Chem*, 273. 5858-5868.
- Roman, G., He, J. & Davis, R. L.** (2000): kurtz, a novel nonvisual arrestin, is an essential neural gene in Drosophila. *Genetics*, 155. 1281-1295.
- Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D. M., Niveleau, A., Plachot, M., Paldi, A. & Viegas-Pequignot, E.** (1998): Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev*, 12. 2108-2113.

- Samuelov, L., Sprecher, E., Tsuruta, D., Biro, T., Kloepper, J. E. & Paus, R.** (2012): P-cadherin regulates human hair growth and cycling via canonical Wnt-signaling and transforming growth factor-beta 2. *J Invest Dermatol*, 132. 2332-2341.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Kouzarides, T.** (2002): Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, 419. 407-411.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W. & Dean, W.** (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 241. 172-182.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H.** (2004): Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 10. 55-63.
- Sawitza, I., Kordes, C., Reister, S. & Häussinger, D.** (2009): The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology*, 50. 1617-1624.
- Sawitza, I., Kordes, C., Götze, S., Herebian, D. & Häussinger, D.** (2015): Bile acids induce hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, 5. 13320. doi: 10.1038/srep13320
- Saxonov, S., Berg, P. & Brutlag, D. L.** (2006): A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103. 1412-1417.
- Schildberg, F. A., Wojtalla, A., Siegmund, S. V., Endl, E., Diehl, L., Abdulla, Z., Kurts, C. & Knolle, P. A.** (2011): Murine hepatic stellate cells veto CD8 T cell activation by a CD54-dependent mechanism. *Hepatology*, 54. 262-272.
- Schuermann, D., Weber, A. R. & Schar, P.** (2016): Active DNA demethylation by DNA repair: Facts and uncertainties. *DNA Repair (Amst)*, 44. 92-102.
- Schumacher, E., Götze, S., Kordes, C., Benes, V., Häussinger, D.** (2017): Combined methylome and transcriptome analysis during rat hepatic stellate cell activation. *Stem Cells Dev.* doi: 10.1089/scd.2017.0128.
- Shapiro, R., Braverman, B., Louis, J. B. & Servis, R. E.** (1973): Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfite. *J Biol Chem*, 248. 4060-4064.
- Shapiro, R., Cohen, B. I. & Servis, R. E.** (1970): Specific deamination of RNA by sodium bisulphite. *Nature*, 227. 1047-1048.
- Shen, H., Cheng, T., Olszak, I., Garcia-Zepeda, E., Lu, Z., Herrmann, S. & Scadden, D. T.** (2001): CXCR-4 desensitization is associated with tissue localization of hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 166. 5027-5033.
- Shen, L., Inoue, A., He, J., Liu, Y., Lu, F. & Zhang, Y.** (2014): Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell*, 15. 459-470.

- Simonsson, S. & Gurdon, J. B.** (2005): Changing cell fate by nuclear reprogramming. *Cell Cycle*, 4. 513-515.
- Sintes, J., Romero, X., de Salort J., Terhorst, C. & Engel, P.** (2010): Mouse CD84 is a pan-leukocyte cell-surface molecule that modulates LPS-induced cytokine secretion by macrophages. *J Leukoc Biol*, 88. 687-697.
- Smith-Berdan, S., Nguyen, A., Hassanein, D., Zimmer, M., Ugarte, F., Ciriza, J. & Forsberg, E. C.** (2011): Robo4 cooperates with CXCR4 to specify hematopoietic stem cell localization to bone marrow niches. *Cell Stem Cell*, 8. 72-83.
- Spees, J. L., Olson, S. D., Ylostalo, J., Lynch, P. J., Smith, J., Perry A., Peister, A., Wang, M. & Prockop, D. J.**(2003): Differentiation, cell fusion and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100. 2397-2402.
- Stein, R., Razin, A. & Cedar, H.** (1982): In vitro methylation of the hamster adenine phosphoribosyltransferase gene inhibits its expression in mouse L cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79. 3418-3422.
- Stewart, G. S. ,Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. & Elledge, S. J.** (2003): MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421. 961-966.
- Suelves, M., Carrio, E., Nunez-Alvarez, Y. & Peinado, M. A.** (2016): DNA methylation dynamics in cellular commitment and differentiation. *Brief Funct Genomics*. doi: 10.1093/bfgp/elw017.
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H. & Tajima, S.** (2004): DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*, 279. 27816-27823.
- Swain, J. L., Stewart, T. A. & Leder, P.** (1987): Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell*, 50. 719-727.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S.** (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126. 663-676.
- Talora, C., Sgroi, D. C., Crum, C. P. & Dotto, G. P.** (2002): Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes Dev*, 16. 2252-2263.
- Tan, L. & Shi, Y. G.** (2012): Tet family proteins and 5-hydroxymethylcytosine in development and disease. *Development*, 139. 1895-1902.
- Tao, H., Huang, C., Yang, J. J., Ma, T. T., Bian, E. B., Zhang, L., Li, J.** (2011): MeCP2 controls the expression of RASAL1 in the hepatic fibrosis in rats. *Toxicology*, 290. 327-333.
- Valinluck, V. & Sowers, L. C.** (2007): Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*, 67. 946-950.



- Wake, K.** (1971): "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat*, 132. 429-462.
- Wan, J., Oliver, V. F., Zhu, H., Zack, D. J., Qian, J. & Merbs, S. L.** (2013): Integrative analysis of tissue-specific methylation and alternative splicing identifies conserved transcription factor binding motifs. *Nucleic Acids Res*, 41. 8503-8514.
- Wang, R. Y., Gehrke, C. W. & Ehrlich, M.** (1980): Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues. *Nucleic Acids Res*, 8. 4777-4790.
- Wang, Z., Kong, D., Sanjeev, B., Li, Y., Adsay, N. V., Abbruzzese, J., Sarka F. H.** (2007): Down-regulation of Platelet-Derived Growth Factor-D Inhibits Cell Growth and Angiogenesis through Inactivation of Notch-1 and Nuclear Factor-KB Signaling. *Cancer Res*, 67. 11377-11385.
- Wang, J., Hevi, S., Kwash, J. K., Lei, H., Gay, F., Bajko, J., Su, H., Sun, W., Chang, H., Xu, G., Gaudet F., Li, E. & Chen, T.** (2009): The lysine demethylase LSD1 (KDM1) is required for maintenance of global DNA methylation. *Nat Genet*, 41. 125-129.
- Wang, Y., Xiao, M., Chen, X., Chen, L., Xu, Y., Lv, L. & Xiong, Y.** (2015): WT1 recruits TET2 to regulate its target gene expression and suppress leukemia cell proliferation. *Mol Cell*, 57. 662-673.
- Watson, P. A., Hanauske-Abel, H. H., Flint, A. & Lalande, M.** (1991): Mimosine reversibly arrests cell cycle progression at the G1-S phase border. *Cytometry*, 12. 242-246.
- Weber, A. R., Krawczyk, C., Robertson, A. B., Kusnierczyk, A., Vagbo, C. B., Schuermann, D. & Schar, P.** (2016): Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat Commun*, 7. doi: 10.1038/ncomms10806
- West, M. H. & Bonner, W. M.** (1980): Histone 2a, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*, 19. 3238-3245.
- Wiebauer, K. & Jiricny, J.** (1990): Mismatch-specific thymine DNA glycosylase and DNA polymerase beta mediate the correction of G.T mispairs in nuclear extracts from human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87. 5842-5845.
- Wolf, S. F., Jolly, D. J., Lunnen, K. D., Friedmann, T. & Migeon, B. R.** (1984): Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81. 2806-2810.
- Wu, J. C. & Santi, D. V.** (1985): On the mechanism and inhibition of DNA cytosine methyltransferases. *Prog Clin Biol Res*, 198. 119-129.
- Wu, S. C. & Zhang, Y.** (2010): Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11. 607-620.
- Yamamizu, K., Matsunaga, T., Uosaki, H., Fukushima, H., Katayama, S., Hiraoka-Kanie, M., & Yamashita, J. K.** (2010): Convergence of Notch and betacatenin signaling induces arterial fate in vascular progenitors. *J Cell Biol*, 189. 325-338.

- 
- Yang, J. J., Tao, H., Huang, C., Shi, K. H., Ma, T. T., Bian, E. B. & Li, J. (2013):** DNA methylation and MeCP2 regulation of PTCH1 expression during rats hepatic fibrosis. *Cell Signal*, 25. 1202-1211.
- Yoder, J. A., Walsh, C. P. & Bestor, T. H. (1997):** Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13. 335-340.
- Yokoi, Y., Namihisa, T., Kuroda, H., Komatsu, I., Miyazaki, A., Watanabe, S. & Usui, K. (1984):** Immunocytochemical detection of desmin in fat-storing cells (Ito cells). *Hepatology*, 4. 709-714.
- Zhang, R. P., Shao, J. Z. & Xiang, L. X. (2011):** GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 286. 41083-41094.
- Zhou, Q. J., Huang, Y. D., Xiang, L. X., Shao, J. Z., Zhou, G. S., Yao, H. & Lu, Y. L. (2007):** In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes induced by fibroblast growth factors and bone morphological protein-4. *Int J Biochem Cell Biol*, 39. 1714-1721.
- Ziller, M. J., Müller, F., Liao, J., Zhang, Y., Gu, H., Bock, C. & Meissner, A. (2011):** Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types. *PLoS Genet*, 7. e1002389. doi: 10.1371/journal.pgen.1002389
- Zomer, H. D., Vidane, A. S., Goncalves, N. N. & Ambrosio, C. E. (2015):** Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning*, 8. 125-134.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Actb</b>	<i>cytoplasmic actin</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
Apc2	<i>adenomatous polyposis coli protein 2</i>
Apex1	<i>DNA-(apurinic or apyrimidinic) lyase</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Ash1	<i>achaete-scute homolog 1</i>
$\alpha$ SMA	<i><math>\alpha</math>-smooth muscle-actin</i>
<b>BER</b>	Basen-Exzisions-Reparatur
BMI	<i>Body Mass Index</i>
Bmp4	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BS-Seq	Bisulfit-Sequenzierung
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CpG (A,T,C)	Cytosin-phosphatidyl-Guanin (Adenin-, Thymin-, Cytosin) Dinukleotid
Cnr	<i>cannabinoid receptor</i> (Cannabinoidrezeptor)
Ct	<i>threshold cycle</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i> (C-X-C Chemokinrezeptor Typ 4)
Cxzc5	<i>CXXC-type zinc finger protein 5</i>
<b>DAPI</b>	4'-6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMG	differentiell methylierte Gene
DMR	differentiell methylierte Regionen
Dnmt	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dtx4	<i>deltex 4</i> (Deltex4)
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

---

ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERV	endogene Retroviren
EZM	extrazelluläre Matrix
<b>FACS</b>	<i>fluorescence assisted cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
Fra-1	<i>fos-related antigen 1</i>
<b>Gadd45</b>	<i>growth arrest and DNA damage inducible protein Gadd45</i>
Gas6	<i>growth arrest specific protein 6</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GO	<i>gene ontology</i>
<b>HCl</b>	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
Hes1	<i>hairy and enhancer of split 1</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>hepatic stellate cells</i>
HSZ	Hepatische Sternzelle/ Hepatische Sternzellen
<b>IAP</b>	<i>inhibitor of apoptosis domain</i>
ICF	Immundefizienz, Zentromerinstabilität und Gesichtsdysmorphismus-Syndrom
ID	<i>identifier elements</i>
Igf2	<i>insulin-like growth factor II</i>
IF	Immunfluoreszenz
iPSZ	induzierte pluripotente Stammzelle
ISCT	Internationale Gesellschaft für Zelltherapie
<b>KD</b>	<i>Knockdown</i>
Klf2	<i>Krüppel-like factor 2</i>
KO	<i>Knockout</i>
<b>Lhx6</b>	<i>LIM/homeobox protein 6</i>
LINE1	<i>long interspersed nuclear element</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lyve1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1</i>

---

<b>mAB</b>	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MBD	Methylbindedomäne
Mdc1	<i>mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MeCP2	<i>methyl-CpG-binding protein 2</i> (Methyl-CpG-bindendes Protein 2)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
miRNA	microRNA
Mml22	<i>methyl-methansulfate sensitive protein 22 like</i> (Methyl-Methansulfat sensitives Protein 22 ähnliches Protein)
Mmrn2	<i>multimerin 2</i> (Multimerin 2)
MSZ	Mesenchymale Stammzelle
<b>NGS</b>	<i>next generation sequencing</i>
Notch	<i>neurogenic locus notch homolog protein</i>
Nsb1	<i>nibrin</i>
<b>Oct4</b>	<i>octamer binding protein 4</i>
<b>pAB</b>	<i>polyclonal antibody</i> (polyklonaler Antikörper)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBST	<i>phosphate buffered saline + Tween20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
Ppar $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PTCH1	<i>protein patched homolog 1</i>
PTEN	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase</i>
<b>Rasal1</b>	<i>RasGAP-activating-like protein 1</i>
Rnf4	<i>ringfinger protein 4</i> (Ringfinger Protein 4)
Robo4	<i>roundabout 4 homolog</i>
Rps6	<i>ribosomal protein S6</i>
RRBS	<i>reduced representation bisulfite sequencing</i>
qAMP	quantitative Analyse der DNA-Methylierung mittels real-time PCR
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (quantitative Polymerase-Kettenreaktion)

---

<b>SAM</b>	S-Adenosyl-Methionin
Sdf1	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SEZ	sinusoidale Endothelzelle
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Smad7	<i>mothers against decapentaplegic homolog 7</i>
Smug1	<i>single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase</i>
Sparcl1	<i>SPARC-like protein 1</i>
SRV	<i>simian retrovirus</i>
Su(H)	<i>Supressor of hairy wings</i>
Sulf2	<i>sulfatase 2</i>
<b>TBS</b>	<i>tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tdg	<i>G/T mismatch-specific thymine DNA glycosylase</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
Tet	<i>ten-eleven translocation</i>
Tet3	<i>methylcytosine dioxygenase 3</i>
TE	Transposable Elemente
Tgf $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TSS	Transkriptionsstartstelle
<b>UTR</b>	untranslatierte Region
<b>VEGF</b>	<i>vascular endothelial growth factor</i>
<b>WB</b>	Western Blot
Wt1	<i>Wilms tumor protein homolog 1</i>
<b>5-azaC</b>	5-Azacytidin
5caC	5-Carboxylcytosin
5fC	5-Formylcytosin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>ABBILDUNG 1:</b> MECHANISMEN DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	2
<b>ABBILDUNG 2:</b> REGULATION DER GENEXPRESSION DURCH DNA-METHYLIERUNG .....	6
<b>ABBILDUNG 3:</b> MECHANISMUS DER TET-KATALYSE.....	9
<b>ABBILDUNG 4:</b> MÖGLICHE MECHANISMEN DER AKTIVEN DNA-DEMETHYLIERUNG.....	10
<b>ABBILDUNG 5:</b> DYNAMIK DER GLOBALEN DNA-METHYLIERUNG WÄHREND DER KULTUR-INDUZIERTEN HSZ- AKTIVIERUNG.....	37
<b>ABBILDUNG 6:</b> QUALITÄTSKONTROLLE METHYL-MINISEQ.....	38
<b>ABBILDUNG 7:</b> DARSTELLUNG DER METHYLOMDATEN IM USCS GENOMBROWSER .....	39
<b>ABBILDUNG 8:</b> DIFFERENTIELL METHylierte REGIONEN WÄHREND DER KULTUR-INDUZIERTEN HSZ-AKTIVIERUNG.. .....	40
<b>ABBILDUNG 9:</b> QUALITÄTSANALYSE DER RNA-PROBEN FÜR DEN GENEXPRESSIONSARRAY. ....	42
<b>ABBILDUNG 10:</b> QUALITÄTSANALYSE AFFYMETRIX GENECHIP RAT GENE 2.0 ST EXPRESSIONSARRAYS .....	43
<b>ABBILDUNG 11:</b> DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG.....	44
<b>ABBILDUNG 12:</b> <i>HEATMAP</i> DER DIFFERENTIEL EXPRIMIERTEN GENE WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	45
<b>ABBILDUNG 13:</b> KORRELATIONSANALYSE DER DNA-METHYLIERUNG UND DER GENEXPRESSION WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG. ....	48
<b>ABBILDUNG 14:</b> EPIGENETISCHE REGULATION DER DTX4-EXPRESSION .....	50
<b>ABBILDUNG 15:</b> EPIGENETISCHE REGULATION DER WT1-EXPRESSION.....	51
<b>ABBILDUNG 16:</b> DIFFERENTIELLE DNA-METHYLIERUNG IM PROMOTER UND DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION VON AUSGEWÄHLTEN GENEN WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	53
<b>ABBILDUNG 17:</b> DIFFERENTIELLE DNA-METHYLIERUNG IM GENKÖRPER UND DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION VON AUSGEWÄHLTEN GENEN WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG. ....	56
<b>ABBILDUNG 18:</b> DER NOTCH-SIGNALWEG WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	58
<b>ABBILDUNG 19:</b> DNA-METHYLIERUNG VERSCHIEDENER REPETITIVER ELEMENTE WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	60
<b>ABBILDUNG 20:</b> $\gamma$ -H2A.X-GEHALT IN AKTIVIERENDEN HSZ .....	61
<b>ABBILDUNG 21:</b> EXPRESSION DER TET-DIOXYGENASEN WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG.....	62
<b>ABBILDUNG 22:</b> EXPRESSION VERSCHIEDENER DEAMINASEN WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	63
<b>ABBILDUNG 23:</b> EXPRESSION VERSCHIEDENER DNA-GLYKOSYLASEN WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG .....	64
<b>ABBILDUNG 24:</b> EXPRESSION VERSCHIEDENER <i>SCAFFOLDER</i> -PROTEINE WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG.....	65

**ABBILDUNG 25:** EXPRESSION VERSCHIEDENER METHYLBINDENDER PROTEINE WÄHREND DER HSZ-AKTIVIERUNG ...  
.....66

**ABBILDUNG 26:** WESTERN BLOT ANALYSEN MÖGLICHER KANDIDATEN FÜR DIE DNA-DEMETHYLIERUNG WÄHREND  
DER HSZ-AKTIVIERUNG ..... 67



## 9 Tabellenverzeichnis

<b>TABELLE 1:</b> LISTE ALLER VERWENDETER GERÄTE .....	15
<b>TABELLE 2:</b> LISTE ALLER VERWENDETER VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	16
<b>TABELLE 3:</b> LISTE ALLER VERWENDETER CHEMIKALIEN. ....	16FF
<b>TABELLE 4:</b> LISTE ALLER VERWENDETER KOMMERZIELLER KOMPLETTSYSTEME .....	18F
<b>TABELLE 5:</b> LISTE ALLER VERWENDETER PUFFER.. .....	19
<b>TABELLE 6</b> AUFLISTUNG ALLER WÄHREND DER ARBEIT VERWENDETER DNA-OLIGONUKLEOTIDE .....	20FF
<b>TABELLE 7:</b> LISTE ALLER VERWENDETER PRIMÄR- UND SEKUNDÄRANTIKÖRPER. ....	22F
<b>TABELLE 8:</b> LISTE ALLER VERWENDETER SOFTWAREPROGRAMME .....	23F
<b>TABELLE 9:</b> ZUSAMMENSETZUNG DES PCR-MASTER MIXES.. .....	28
<b>TABELLE 10:</b> ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZES ZUR UMSCHREIBUNG VON RNA IN CDNA. ....	31
<b>TABELLE 11:</b> ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSANSATZES FÜR DIE QUANTITATIVE PCR.....	31F
<b>TABELLE 12:</b> WICHTIGE BIOLOGISCHE FUNKTIONEN DIFFERENTIELL METHYLIERTER GENE WÄHREND DER HSZ- AKTIVIERUNG.. .....	41
<b>TABELLE 13:</b> WICHTIGE BIOLOGISCHE FUNKTIONEN DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER GENE.....	46
<b>TABELLE 14:</b> ZUSAMMENFASSUNG DER DNA-METHYLIERUNGS- UND GENEXPRESSIONSÄNDERUNGEN FÜR AUSGEWÄHLTE GENE MIT DIFFERENTIELLER PROMOTER- ODER GENKÖRPERMETHYLIERUNG. ....	54

## Publikationen und Posterbeiträge

Götze, S., Quenkert, E.C., Kordes, C., Sawitza, I., Häussinger, D. (2014): Epigenetic regulation during hepatic stellate cell activation. *Eur J Med Res*, 19. 7.

Götze, S., Schumacher, E.C., Kordes, C., Häussinger, D. (2015): Epigenetic changes during hepatic stellate cell activation. *PLoS One*, 10. e0128745.

Kordes, C., Sawitza, I., Götze, S., Schumacher, E.C., Häussinger, D. (2015): Beyond fibrosis: stellate cells as liver stem cells. *Z Gastroenterol*, 53. 1425-1431.

Schumacher, E., Götze, S., Kordes, C., Benes, V., Häussinger, D. (2017): Combined methylome and transcriptome analysis during rat hepatic stellate cell activation. *Stem Cells Dev.* doi: 10.1089/scd.2017.0128.

Götze S., Quenkert E.C., Kordes, C., Sawitza, I., Häussinger, D. (2014): Epigenetic regulation during hepatic stellate cell activation. *1<sup>st</sup> International Conference "Liver Damage and Regeneration" of the Collaborative Research Center SFB974*. Düsseldorf, Deutschland.

Schumacher, E.C., Götze, S., Kordes, C., Häussinger, D. (2015): Epigenetic changes during in vitro activation of hepatic stellate cells. *8<sup>th</sup> International Meeting of the Stem Cell Network NRW*. Bonn, Deutschland.

Schumacher, E.C., Götze, S., Kordes, C., Häussinger, D. (2015): Epigenetic changes during in vitro activation of hepatic stellate cells. *EMBO Conference "Chromatin and Epigenetics"*. Heidelberg, Deutschland.

Schumacher, E.C., Götze, S., Kordes, C., Häussinger, D. (2016): DNA methylation changes during hepatic stellate cell activation. *Falk Workshop „ Communication and System Relevance in Liver Damage and Regeneration"*. Düsseldorf, Deutschland.

Schumacher, E.C., Götze S., Kordes C., Häussinger, D. (2016): Epigenetic changes contribute to hepatic stellate cell activation. *32. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL)*. Düsseldorf, Deutschland.

Schumacher, E.C., Götze, S., Kordes, C., Häussinger, D. (2017): Epigenetics during hepatic stellate cell activation. *19<sup>th</sup> International Symposium On Cells Of The Hepatic Sinusoid (ISCHS)*. Galway, Irland.

Schumacher, E.C., Götze, S., Kordes, C., Häussinger, D. (2017): Exploring methylome and transcriptome of activating hepatic stellate cells. *deLIVER 2017: Technology in Hepatology*. Düsseldorf, Deutschland.

## Lebenslauf

### Zur Person

Name	Eva Schumacher, geb. Quenkert
Adresse	Gotlandweg 27 59494 Soest
E-Mail	Eva.Schumacher@gmx.net
Geburtsdatum	01.01.1985
Geburtsort	Soest
Nationalität	deutsch

### Schullaufbahn

August 1991- Juli 1995	Gemeinschaftsgrundschule Borgeln
August 1995- Juni 2004	Städtisches Aldegrevergymnasium Soest

### Akademischer Werdegang

November 2005- September 2008	Universität Gießen Studium der Zahnmedizin
Oktober 2008- September 2011	Universität Gießen Studium der Biologie Abschluss: Bachelor of Science (Note 1,8) Titel der Abschlussarbeit: Charakterisierung von dCTCF/CP190- Interaktionspartnern.
Oktober 2011- September 2013	Universität Gießen Studium der Biologie Abschluss: Master of Science (Note 1,0) Titel der Abschlussarbeit: Flottilin-1 als MAP-Kinase- <i>Scaffold</i>
Oktober 2013- Dezember 2016	Universität Düsseldorf Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektionskrankheiten Graduiertenkolleg des SFB 974 Thema: Epigenetische Regulation der Hepatischen Sternzell-Aktivierung.

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2013 bis Dezember 2016 in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. D. Häussinger angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich gerne herzlich bei allen bedanken, die diese Zeit für mich zu einer guten und lehrreichen Zeit gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D. Häussinger, der als Projektleiter und Doktorvater stets ein offenes Ohr und gute Anregungen zum Verlauf der Forschungen hatten.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. E. Lammert für die bereitwillige Übernahme der Rolle des Zweitgutachters.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. Silke Götze und Herrn Dr. Claus Kordes für die gute Einarbeitung, die engagierte Betreuung während des gesamten Projekts sowie Beratung und Hilfestellung während der Niederschrift dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich des Weiteren bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Teilprojekts A02 im SFB974 für die stets freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und fruchtbare Diskussionen über Methoden und Ergebnisse.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde weder in der vorgelegten, noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine Promotionsversuche unternommen.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift