

Expressionsanalysen von hepatischen microRNA in
murinen Langzeit-Modellen der hepatischen Cholestase

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt
von
Tilman Würger
aus Freiburg im Breisgau (Baden-Württemberg)

Gießen, 2020

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Schwerpunkt Gastroenterologie
Leiterin: Prof. Dr. med. Elke Roeb
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. med. Elke Roeb
Gutachter: PD Dr. med. Jochen Pöling

Tag der Disputation: 11. November 2020

Konzeptionelle Überlegungen wurden im Rahmen folgender Veröffentlichungen getätigt und Teile dieser Arbeit unter folgenden Titeln publiziert:

Originalarbeiten:

„Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background“

Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, Würger T, Schröder D, Matono T; Mollenkopf HJ; Montalbano R; Pompaiah M; Reifenberg K; Zahner D; Ocker M; Gerlich W; Glebe D; Roeb E (2014)

PLoS ONE 9(3): e90608. doi:10.1371/journal.pone.0090608 [1]

Abstracts und Posterbeiträge:

1) „Verstärkte hepatische Expression neuer MicroRNA bei ABCB4^{-/-}- Mäusen im Langzeitmodell“

T Würger, Y Churin, M Roderfeld, E Roeb

131. Jahrestagung der GASL, 30. – 31.01.2015, München

Posterpräsentation 1.51

Z Gastroenterol 2015; 53: 1-66, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York [2]

2) „Direkte proapoptotische und onkogene Effekte des

Hepatitis-B-Oberflächenproteins in der Leber HBV-transgener Mäuse“

Würger T, Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, Reifenberg K, Mollenkopf H-J, Schröder D, Montalbano R, Ocker M, Glebe D, Roeb E

22. Kongress der MGG, 03. – 04.05.2013, Frankfurt

Posterpräsentation No.: 15022013_abs088

Gastroenterologie 2013, 4: 362, Springer Verlag Berlin Heidelberg [3]

3) „Direkte zytotoxische Effekte des Hepatitis-B-Virus-Oberflächenproteins in der Leber“

Y Churin, T Würger, M Roderfeld, J Stiefel, K Reifenberg, HJ Mollenkopf, D Schröder, R Montalbano, M Ocker, D Glebe, E Roeb

129. Jahrestagung der GASL, 25. – 26.01.2013, Hannover

Posterpräsentation 5.07

Z Gastroenterol 2013, 51: 1-167, Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York [4]

Mama, Papa: Danke.

1	EINLEITUNG	1
1.1	MicroRNA	1
1.1.1	Geschichte der microRNA	2
1.1.2	Entwicklung der microRNA-assoziierten Publikationen	2
1.1.3	Biogenese der microRNA	3
1.1.3.1	MicroRNA-Biogenese im Zellkern	3
1.1.3.2	MicroRNA-Biogenese im Zytoplasma	5
1.1.3.3	Aufbau des microRNA-induced-silencing-complex (miRISC)	6
1.1.4	Interaktion zwischen microRNA und der Ziel-mRNA	7
1.1.4.1	Mechanismen der microRNA-vermittelten Translationsinhibition	9
1.1.4.2	Strukturelle Merkmale und Protein-Interaktion der mRNA als Grundlage für die microRNA-mRNA-Interaktion	9
1.1.4.3	Mechanismus der Repression nach Translationsinitiation	10
1.1.4.4	Mechanismus der Repression während der Translationsinitiation	11
1.1.4.5	Mechanismus der Degradation der Ziel-mRNA	11
1.2	Leber und Cholestase	13
1.2.1	Physiologische Grundlagen	13
1.2.2	Murine Cholestase-Modelle	14
1.2.2.1	ABCB4 ^{-/-} -Mausmodell	14
1.2.3	Expressionsänderungen von microRNA in cholestatischen Lebererkrankungen	16
1.3	Hepatitis-B-Virus	18
1.3.1	Aufbau des Hepatitis-B-Virus	18
1.3.2	Replikation des Hepatitis-B-Virus	19
1.3.3	Verlaufsformen der Hepatitis-B-Virusinfektion	21
1.3.3.1	Akute Virushepatitis	21
1.3.3.2	Chronische Virushepatitis	21
1.3.4	Modell der HBs-transgenen Maus	22
1.3.5	Expressionsänderungen von microRNA bei Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus	24
2	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	27
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Array-Analysen in Lebergewebe von weiblichen HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 16 Wochen	28
3.1.1	Ergebnisse des microRNA-PCR-Array	28
3.1.2	Ergebnisse des micro-Array	31
3.1.2.1	Verstärkt exprimierte microRNA mit einer Signalintensität von mindestens 500	32
3.1.2.2	Vermindert exprimierte microRNA mit einer Signalintensität von mindestens 500	33
3.1.2.3	Verstärkt oder vermindert exprimierte microRNA mit einer Signalintensität von unter 500	34

3.2 Weiterführende Expressionsanalysen einzelner microRNA mittels qRT-PCR	38
3.2.1 MiR-199a-3p in HBVTg-, ABCB4 ^{-/-} - und HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen	38
3.2.2 MiR-182a-5p in HBVTg-, ABCB4 ^{-/-} - und HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen	39
3.2.3 MiR-21a-5p in HBVTg-, ABCB4 ^{-/-} - und HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen	40
3.2.4 MiR-122-5p in HBVTg-, ABCB4 ^{-/-} - und HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen	42
3.2.5 MiR-23a-3p in HBVTg-, ABCB4 ^{-/-} - und HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen	44
3.2.6 MiR-101a-3p in HBVTg-, ABCB4 ^{-/-} - und HBVTg-ABCB4 ^{-/-} -Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen	45
4 DISKUSSION.....	47
4.1 Konzeptionelle Überlegungen	47
4.2 Ergebnisdiskussion	49
4.2.1 MiR-199a-3p	50
4.2.2 MiR-182-5p	51
4.2.3 MiR-21a-5p	52
4.2.4 MiR-122-5p	53
4.2.5 MiR-23a-3p	55
4.2.6 MiR-101a-3p	56
4.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit	58
4.3.1 Verwendete Tiermodelle	58
4.3.2 Verwendete Analysemethoden	59
4.3.3 Thematik im Hinblick auf den aktuellen Forschungsstand	59
4.4 Zusammenfassung	60
4.5 Summary	61
4.6 Ausblick	63
5 MATERIAL UND METHODEN.....	65
5.1 Verwendete Geräte und Materialien	65
5.1.1 Geräte und Software	65
5.1.2 Kommerzielle Kits	67
5.1.3 Verbrauchsmaterialien	67
5.1.4 Chemikalien und Reagenzien	68
5.1.5 TaqMan Primer-Assays	69
5.2 Mausmodelle	70
5.2.1 Übersicht der Mausmodelle sowie Zulassungsnummern	70

5.2.2	Herkunft, genetische Abstammung sowie Kreuzung der Mausmodelle.....	71
5.2.2.1	BALB/c-Tg(Alb1HBV) und BALB/c-Wt	71
5.2.2.2	BALB/c-ABCB4 ^{-/-}	71
5.2.2.3	BALB/c-ABCB4 ^{-/-} -Tg(ALB1HBV).....	72
5.2.3	Probenentnahme, -verarbeitung und -lagerung.....	72
5.3	Molekularbiologische Methoden	72
5.3.1	RNA-Isolierung.....	72
5.3.2	Bestimmung des RNA-Gehalts mittels Spektrophotometer	73
5.3.3	RNA-Agarose-Gelelektrophorese	75
5.3.4	Transkription von microRNA zu cDNA.....	77
5.3.4.1	Reverse Transkription unter Verwendung des miScript II RT Kit.....	78
5.3.4.2	Reverse Transkription unter Verwendung des TaqMan-Assays	80
5.3.5	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	82
5.3.5.1	Prinzip der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion.....	82
5.3.5.2	Funktionsprinzip der qRT-PCR unter Verwendung von SYBR-Green.....	83
5.3.5.3	Funktionsprinzip der qRT-PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden	84
5.3.5.4	Versuchsansatz qRT-PCR – Qiagen miFinder PCR-Array	84
5.3.5.5	Ansatz qRT-PCT - TaqMan-Assay.....	86
5.3.6	qRT-PCR-Messung.....	87
5.3.6.1	qRT-PCR-Messung - miFinder PCR-Array.....	88
5.3.6.2	qRT-PCR-Messung – TaqMan-Assay.....	89
5.3.7	MicroRNA-micro-Array	89
5.3.7.1	Probenpräparation für den microRNA micro-Array	91
5.4	Datenbearbeitung und Auswertung	91
5.4.1	Messergebnisse des Mouse miFinder PCR-Array.....	91
5.4.2	Messergebnisse der qRT-PCR mit TaqMan-Assays	91
5.4.3	Messergebnisse des micro-Array	91
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	92
7	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	116
8	DANKSAGUNG	117

1

1 Einleitung

1.1 MicroRNA

Unter dem Begriff microRNA (syn.: miRNA, miR) werden einzelsträngige, nicht-kodierende RNA-Moleküle mit einer Länge von 22-25 Nukleotiden zusammengefasst, welche durch Bindung an unterschiedlichen Regionen von messengerRNA (mRNA) zu einer Blockade der Translation in funktionsfähige Proteine oder zu einer vollständigen Degradation der entsprechenden mRNA führen können [5–7]. Durch diese Interaktion greifen diese RNA, welche meist mehrere hundert Zielsequenzen besitzen, entscheidend in die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression ein [8–10].

In den letzten Jahren wurde die Forschung auf diesem Gebiet intensiviert, sodass zunehmend neue microRNA entdeckt wurden. Allein in der Gattung Homo sapiens sind mehr als 2500 verschiedene microRNA-Moleküle bekannt. Schätzungen gehen davon aus, dass 30% bis 60% der proteinkodierenden Gene von Säugetieren unter dem Einfluss von microRNA stehen [10–13].

MicroRNA spielen physiologisch eine bedeutende Rolle in biologischen Prozessen [14–19]. Aufgrund ihrer Funktionen wird dieser Klasse von RNA-Molekülen eine große Bedeutung bei der Entstehung sowie der Modulation von Erkrankungen zugeschrieben [20, 21]. Von besonderem Interesse sind beispielsweise die microRNA-Expressionsmuster in diversen Tumoren [22, 23].

Praxisnah wird aktuell die Verwendung von microRNA als zirkulierender Biomarker zur Früherkennung verschiedenster Erkrankungen diskutiert [24–28]. Ein langfristiges Ziel ist es, microRNA als potenzielles Ziel pharmakologischer Interventionen oder als eigene Medikamentenklasse zu etablieren [29–33]. Aktuell befindet sich diese Entwicklung jedoch noch in einem Anfangsstadium und bis zum möglichen Einsatz von microRNA als therapeutisches Mittel wird noch viel Zeit vergehen.

Es ist einerseits notwendig, die möglichen Zielsequenzen einzelner microRNA zu erkennen, deren Funktion zu verstehen und anschließend in einen Kontext mit der Ätiopathogenese verschiedener Krankheiten zu bringen. Andererseits müssen die Expressionsänderungen dieser RNA-Klasse sowohl in der physiologischen Entwicklung als auch in Pathologien untersucht werden. Mit einer Kombination dieser beiden Wege lässt sich ein umfassendes Bild der Funktionen und des Potentials von microRNA erstellen, welche in zukünftigen Untersuchungen und letztendlich zu therapeutischen Zwecken genutzt werden könnten.

1.1.1 Geschichte der microRNA

Im Jahr 1993 beschrieben Victor Ambros und Rosalind Lee im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) erstmals das Gen *lin-4*, welches nicht für ein Protein kodierte, sondern für zwei kurze, aus 22 beziehungsweise 61 Nukleotiden bestehenden, RNA-Moleküle. Diese RNA wiesen Sequenzen auf, welche komplementär zu Abschnitten der 3'-untranslatierten Region der mRNA für das Protein *lin-14* waren. Die Autoren bezeichneten diese RNA aufgrund ihrer Expressionsänderung zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Larvenentwicklung von *C. elegans* zunächst als stRNA (small temporal RNA) und zeigten, dass die Translation von *lin-14* durch eine RNA-RNA-Interaktion inhibitorisch beeinflusst wurde [34]. Diese Beeinflussung auf posttranskriptioneller Ebene wurde zunächst als ein seltener Vorgang angesehen. Um die Jahrtausendwende kam allerdings eine Arbeitsgruppe in Harvard zu vergleichbaren Ergebnissen [35], sodass eine Neubewertung der kurzen RNA-Moleküle erfolgte. Durch eine Vielzahl in der Folgezeit veröffentlichter wissenschaftlicher Arbeiten und dem daraus generierten Erkenntnisgewinn wurde diese Klasse nicht-kodierender RNA ab 2001 unter der Bezeichnung der microRNA zusammengefasst [36–41].

1.1.2 Entwicklung der microRNA-assozierten Publikationen

Das steigende Interesse der Forschung an microRNA lässt sich anhand Analysen der Meta-Datenbank PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) nachvollziehen. Eine Recherche nach den Begriffen miR, miRNA und microRNA zeigt einen exponentiellen Anstieg der microRNA-bezogenen Veröffentlichungen in den letzten Jahren [42]. Eine vergleichbare Entwicklung lässt sich in den vergangenen Jahren auch im Hinblick auf online verfügbare Datenbanken mit Informationen zu microRNA feststellen.

Die bekannteste und umfangreichste dieser Datenbanken ist miRBase (www.mirbase.org). Seit ihrer Gründung im Jahr 2002 ist der Umfang über die Jahre auf über 38.000 Einträge angewachsen.

1.1.3 Biogenese der microRNA

Die microRNA-Biogenese umfasst eine Vielzahl von Prozessierungsschritten und findet sowohl im Zellkern (siehe Kapitel 1.1.3.1) als auch im Zytoplasma (siehe Kapitel 1.1.3.2) statt [43, 44].

1.1.3.1 MicroRNA-Biogenese im Zellkern

Rund die Hälfte der Gene, welche für microRNA codieren, ist im Genom entweder monocistronisch mit eigenen oder polycistronisch in Clustern mit gemeinsamen Promotoren organisiert. Analysen haben zudem ergeben, dass diese Transkriptionseinheiten mehr als 1 kb von bekannten Genen entfernt sind und zum Teil eine antisense-Orientierung aufweisen. Aufgrund dieser Befunde wird angenommen, dass microRNA mit dieser Lokalisation unabhängig von weiteren Genen transkribiert werden [45].

Auf der anderen Seite ist ein quantitativ ähnlich großer Teil der microRNA-Gene intronisch in proteinkodierenden Genen und in Transkripten von long-non-coding RNA lokalisiert und wird aus diesem Grund als Mirtrons bezeichnet [46]. Diese microRNA werden gemeinsam mit den entsprechenden Genen transkribiert [8, 47–49], besitzen zum Teil aber auch eigene Promotoren [50, 51]. Die Genlokalisierung entscheidet über den Syntheseweg: microRNA, deren Gene mono- oder polycistronisch organisiert sind, entstehen über den sogenannten kanonischen Weg, wohingegen Mirtrons über einen alternativen, nicht-kanonischen Syntheseweg prozessiert werden [52].

Der kanonische Weg beginnt mit der Transkription durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II und in einigen Fällen durch die RNA-Polymerase III (Abbildung 1, ①) [53]. Das dabei entstehende Primärtranskript hat eine Länge von 500 bis 3000 Nukleotiden und wird als pri-microRNA (primary microRNA) bezeichnet (Abbildung 1, ②). Es weist typischerweise eine 7-Methylguanosin-Kappe sowie einen Poly-A-Schwanz am 5'- bzw. 3'-terminalen Ende auf und bildet eine Haarnadelstruktur [47]. In diesem Transkript sind oft mehrere microRNA-Sequenzen zusammengefasst.

Die weitere Prozessierung erfolgt in einem Komplex (Abbildung 1, ③), bestehend aus dem RNase-III-Enzym Drosha und dem Cofaktor DGCR8 (DiGeorge syndrome chromosomal region 8), welcher für die initiale Erkennung und Bindung an die pri-microRNA benötigt wird [54–57]. Die resultierenden Produkte werden als pre-microRNA (precursor-microRNA, Abbildung 1, ④) bezeichnet. Sie sind nur noch ca. 70 Basenpaare lang, weisen eine charakteristische Haarnadelstruktur auf und besitzen einen 2-Nukleotid-Überhang am 3'-terminalen Ende, welcher für den späteren Export in das Zytoplasma und die weitere Prozessierung von Bedeutung ist [58–60].

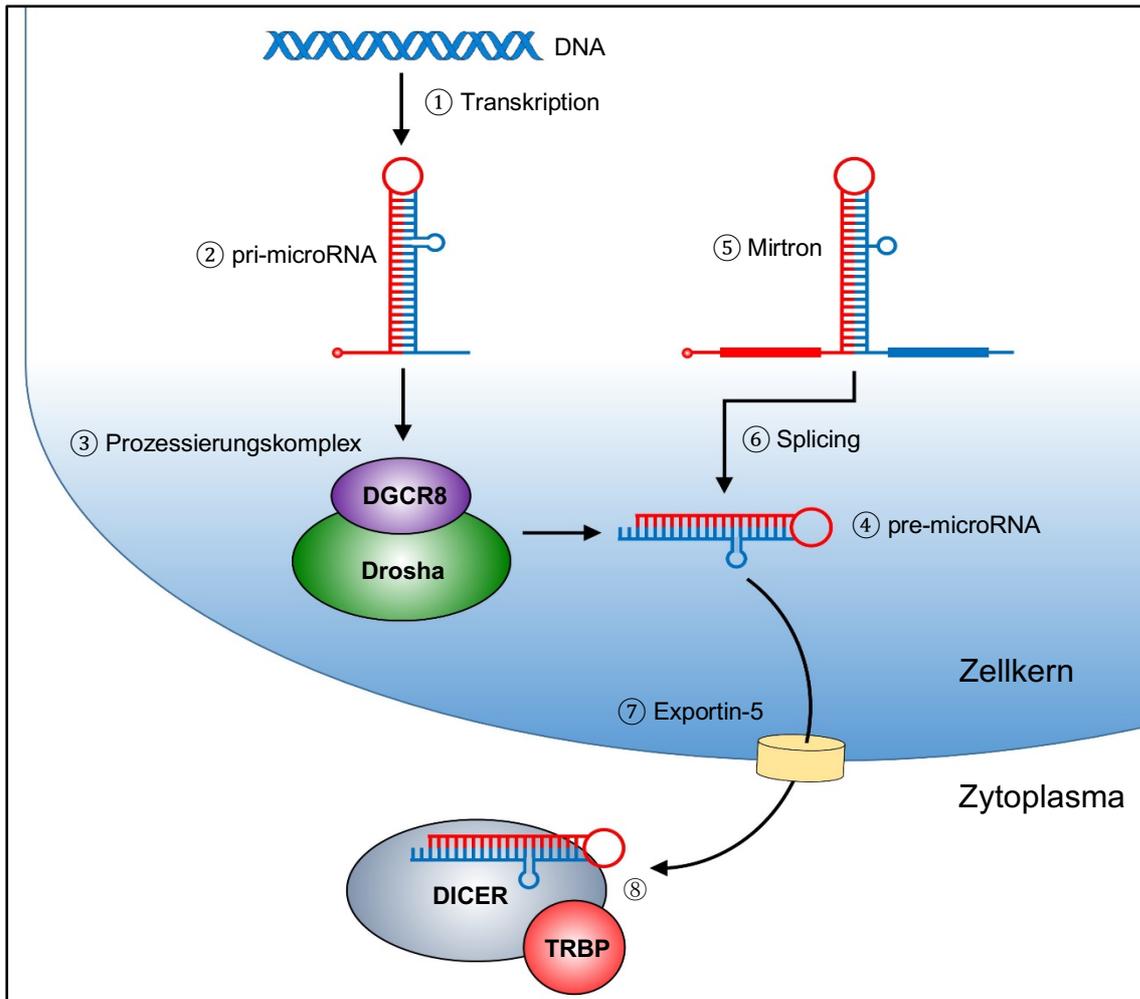


Abbildung 1: Abschnitte der microRNA-Biogenese im Zellkern. Dargestellt sind sowohl der kanonische als auch ein nicht-kanonischer Syntheseweg. Der kanonische Syntheseweg beginnt mit der Transkription (1) von microRNA-codierenden Genen und führt über mehrere Prozessierungsschritte zu dem Zwischenprodukt pre-microRNA (4). Der nicht-kanonische Syntheseweg hingegen führt über das Splicing von Mirtrons direkt zur pre-microRNA. Unabhängig vom Syntheseweg wird jede pre-microRNA durch das Transportprotein Exportin-5 (7) in das Zytoplasma exportiert, wo die Biogenese abgeschlossen wird (8) (Abbildung nach [44] und [61], modifiziert).

Der nicht-kanonische Syntheseweg von Mirtrons (Abbildung 1, (5)) verläuft hingegen unter Umgehung des Prozessierungskomplexes. Durch Splicing (Abbildung 1, (6)) und weitere enzymatische Prozessierung entsteht ein Produkt, dessen Struktur der pre-microRNA entspricht [62, 63]. Unabhängig vom Syntheseweg wird jegliche pre-microRNA aufgrund ihres charakteristischen 3'-terminalen Nukleotid-Überhangs von dem nukleozytoplasmatischen Transportprotein Exportin-5 (Abbildung 1, (7)) erkannt und aktiv aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert, wo die weitere Prozessierung stattfindet (Abbildung 1, (8) sowie 1.1.3.2) [64].

1.1.3.2 MicroRNA-Biogenese im Zytoplasma

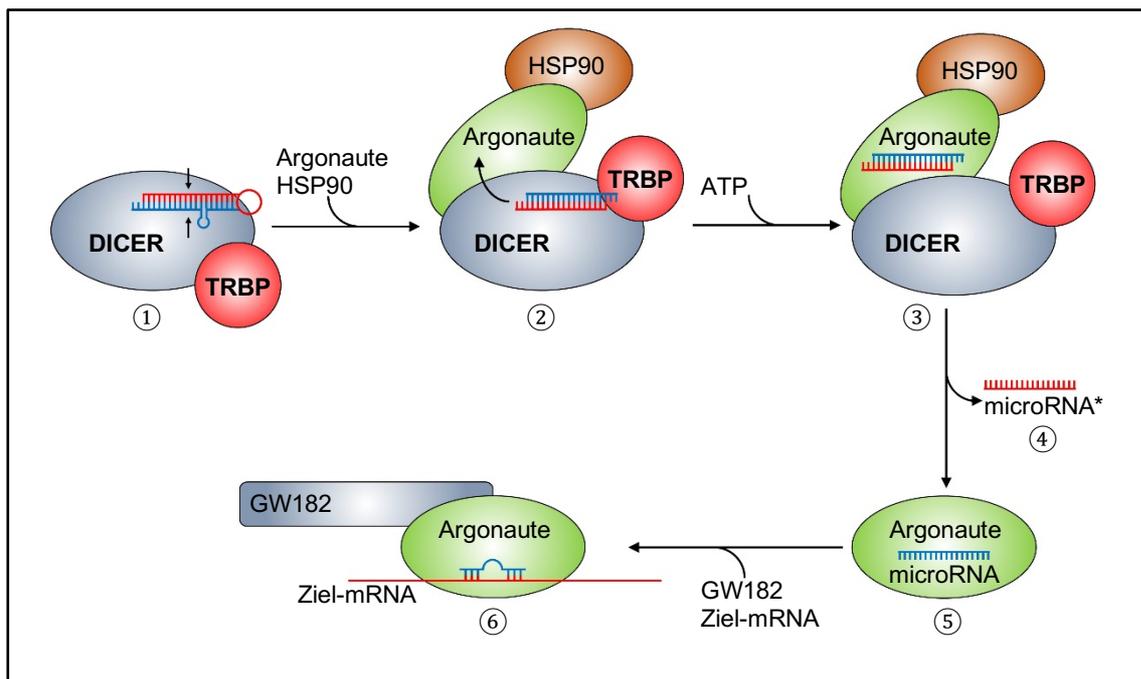


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der zytoplasmatischen Abschnitte der microRNA-Biogenese und Formierung des miRISC (*microRNA-induced silencing complex*). Zunächst erfolgt die weitere Prozessierung der pre-microRNA durch das Enzym Dicer sowie eine Vielzahl von Cofaktoren (① - ③). Die microRNA:microRNA*-Duplex wird dabei gespalten, der eine Strang (microRNA*) abgebaut (④), der andere hingegen (microRNA) Teil des miRISC (⑤, ⑥); Abbildung nach [61], modifiziert).

Die exportierten pre-microRNA werden im Zytoplasma zunächst von einem Komplex, bestehend aus dem RNase-III-Enzym Dicer und dem ds-RNA-Bindeprotein TRBP (TAR RNA binding protein) gebunden (Abbildung 2). Dicer positioniert die pre-microRNA korrekt und interagiert mit dem 3'-terminalen Nukleotid-Überhang, woraufhin der Loop, welcher die beiden pre-microRNA-Stränge miteinander verknüpft, durch die endonukleolytische Funktion von Dicer abgetrennt wird (Abbildung 2, ①, dargestellt durch die Pfeile) [65, 66]. Das Ergebnis dieser Prozessierung ist ein doppelsträngiger RNA-Komplex, dessen Einzelstränge eine Länge von 21-23 Nukleotiden haben, jeweils am 5'-Ende phosphoryliert sind und am 3'-Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden aufweisen. Welcher der beiden Stränge der als microRNA:microRNA* bezeichneten Duplex im weiteren Verlauf Teil des für die mRNA-Interaktion verantwortlichen miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) wird, ist abhängig von der thermodynamischen Asymmetrie des Doppelstrangs. Diese kommt dadurch zustande, dass Unterschiede in der Stabilität der einzelnen Basenpaarungen existieren und dass die Bindung zwischen den Einzelsträngen Fehler aufweist, wodurch Strukturschwächen entstehen [67, 68].

Das ds-RNA-Bindeprotein TRBP erkennt diese Asymmetrie und sorgt für eine optimale Positionierung der RNA-Duplex an der zweiten RNA-Bindungsstelle von Dicer (Abbildung 2, ②) [69]. Gemeinsam mit einem Argonaute-Protein bilden Dicer und TRBP nun den sogenannten miRISC-loading-complex, welcher die Aufgabe besitzt, die RNA-Duplex in das AGO-Protein zu laden. Dies geschieht mithilfe von Chaperonen und durch Hydrolyse von ATP (Abbildung 2, ③) [70–72].

Das AGO-Protein entwindet mit seiner N-terminalen Domäne daraufhin den gebundenen RNA-Doppelstrang und spaltet diesen. Die entstandenen Einzelstränge werden als microRNA* (passenger strand, Abbildung 2, ④) beziehungsweise als microRNA (guide strand, Abbildung 2, ⑤) bezeichnet. Der guide strand entspricht dem thermodynamisch schwächeren Strang und wird Bestandteil des miRISC (Abbildung 2, ⑥), der passenger strand hingegen wird aus dem AGO entfernt und abgebaut. Mit diesem Schritt ist die Biogenese der microRNA abgeschlossen. Im nächsten Schritt erfolgt die Formierung des miRISC-Komplexes, welcher die microRNA-assoziierte Wirkung vermittelt.

1.1.3.3 Aufbau des microRNA-induced-silencing-complex (miRISC)

Der miRISC (microRNA-induced silencing complex) ist ein Konglomerat aus einer Vielzahl von Proteinen sowie der reifen microRNA und stellt in seiner Gesamtheit den Effektor der microRNA-vermittelten Gen-Repression dar.

Die microRNA bildet hierbei das Zentrum dieses Komplexes, welches für die Erkennung der Ziel-mRNA nötig ist. Die eigentliche Funktion des miRISC besteht zum einen darin, durch Interaktion mit weiteren Proteinen entweder die Translation einer mRNA in ein funktionsfähiges Protein an verschiedenen Angriffspunkten zu blockieren oder den vollständigen Abbau dieser Ziel-mRNA einzuleiten [8].

Der zentrale Bestandteil des miRISC ist ein Vertreter der Argonaute-Familie (AGO), welche eine heterogene Gruppe von evolutionär stark konservierten Proteinen bildet und deren Mitglieder zentrale Funktionen in der Aktivierung und Regulation von Genen übernehmen. In Abhängigkeit von der Spezies codiert das Genom für bis zu 27 Argonautenproteine. In Säugetieren sind die Subtypen AGO1 und AGO2 am Aufbau des miRISC beteiligt. In den Spezies *C. elegans* und *D. melanogaster* werden diese Proteine als ALG1/ALG2 beziehungsweise Argonaute1 bezeichnet [73, 74].

Argonaute-Proteine bestehen strukturell aus zwei Untereinheiten, welche insgesamt aus vier Domänen aufgebaut sind (siehe Abbildung 3). Die erste Untereinheit wird von der N-terminalen- und der Piwi-Argonaut-Zwilli (PAZ)-Domäne gebildet. Die andere Untereinheit wird durch die MID- und die c-terminale Domäne PIWI (p-element induced wimpy testis) aufgebaut [75]. Die PAZ-Domäne ist für die Bindung der jeweiligen

microRNA an ihrem 2-Nukleotid-Überhang am 3'-terminalen Ende verantwortlich [76], wohingegen die mid-Domäne mit dem 5'-terminalen Ende der microRNA interagiert. Die c-terminale PIWI-Domäne ähnelt strukturell einer RNase-H und ist für die katalytische Spaltung der Ziel-mRNA essenziell [77].

Argonaute-Proteine sind durch Interaktionen mit weiteren Cofaktoren wie beispielsweise Proteine der GW182-Familie die zentralen Effektoren des miRISC. Es konnte gezeigt werden, dass der microRNA-vermittelte Abbau von mRNA ohne diese Proteine stark beeinträchtigt ist [78]. Zudem erfüllt der gesamte Komplex nur dann einen zielgerichteten Effekt und eine kontrollierte regulatorische Aufgabe, wenn microRNA und Argonaute-Protein interagieren [79].

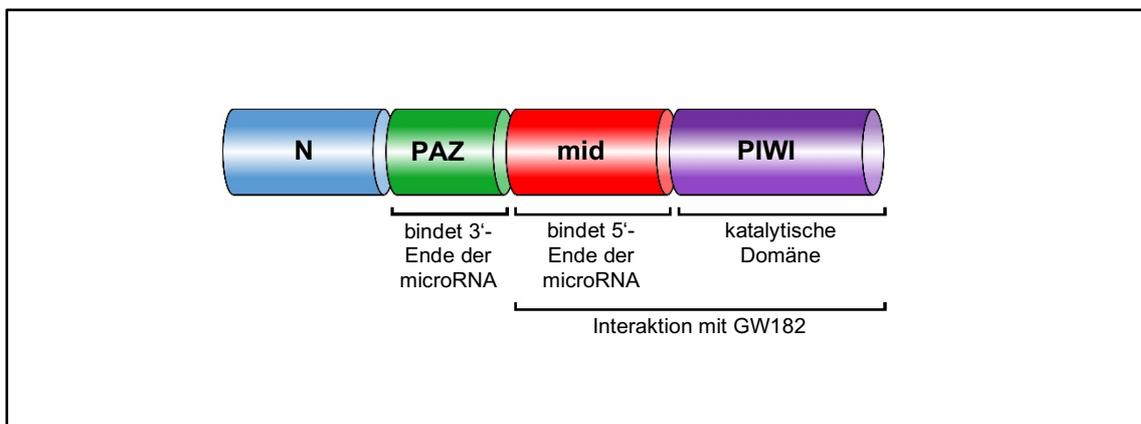


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des humanen Argonaute-2-Proteins (AGO).

AGO bestehen aus zwei Untereinheiten mit insgesamt vier Domänen. Die erste Untereinheit wird von der N-terminalen- und der PAZ-Domäne, welche das 3'-terminale Ende der microRNA bindet, gebildet. Die zweite Untereinheit wird von der mid-Domäne, die mit dem 5'-terminalen Ende der microRNA interagiert, und der PIWI-Domäne, welche strukturell einer RNase-H entspricht, aufgebaut (Abbildung nach [80], modifiziert).

1.1.4 Interaktion zwischen microRNA und der Ziel-mRNA

Die Interaktion einer microRNA, respektive des formierten miRISC, mit der jeweiligen Zielsequenz einer mRNA beruht auf der Watson-Crick-Basenpaarung. Der Grad der Komplementarität ist hierbei von Spezies zu Spezies unterschiedlich und führt zu unterschiedlicher nachfolgender Prozessierung (siehe Abbildung 4).

1.1.4.1 Mechanismen der microRNA-vermittelten Translationsinhibition

Nach Bindung des miRISC an die spezifische Ziel-mRNA bestehen mehrere Möglichkeiten, wie die Translation in ein funktionsfähiges Protein blockiert werden kann. Einerseits kann es durch Interaktion des miRISC mit verschiedenen Proteinen zu einer effizienten Hemmung der Translation einer mRNA kommen. In diesem Falle ist eine Blockade während der Translationsinitiation oder in nachfolgenden Schritten möglich. Ein weiterer Mechanismus der Translationsinhibition besteht darin, die komplette Degradation der jeweiligen Ziel-mRNA zu vermitteln.

1.1.4.2 Strukturelle Merkmale und Protein-Interaktion der mRNA als Grundlage für die microRNA-mRNA-Interaktion

Um zu verstehen, wie der miRISC mit der entsprechenden Ziel-mRNA interagiert, ist es notwendig, die Bedeutung der 5'-terminalen-7-Methylguanosin-Cap sowie der 3'-terminalen Poly-A-Sequenz einer mRNA im Rahmen der Translations-Initiation zu erläutern. Diese dienen als Interaktionspartner für Proteine, welche den Initiationskomplex bilden. Im Rahmen dieses Prozesses wird die 5'-terminale 7-Methylguanosin-Cap der mRNA im Zytoplasma zunächst durch den Proteinkomplex eIF4F (eukariotic translation initiation factor 4 F, siehe Abbildung 5) erkannt. Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten mit der Bezeichnung eIF4E, eIF4G und eIF4A. eIF4E bindet die 5'-7-Methylguanosin-Cap, während die weiteren Untereinheiten eIF4G und eIF4A als Gerüst für den späteren Aufbau des Translations-Initiations-Komplexes beziehungsweise als Helicase dienen. Die zusätzliche Interaktion von eIF4G mit einem weiteren Initiationsfaktor, eIF3 (eukariotic translation initiation factor 3), begünstigt die Rekrutierung der ribosomalen 40S-Untereinheit, welche daraufhin die 5'-UTR-Region nach dem Startcodon AUG absucht. Durch Anlagerung der ribosomalen 60S-Untereinheit wird die Bildung des Translationskomplexes abgeschlossen und die Elongationsphase beginnt [84].

Am 3'-terminalen Poly-A-Schwanz hingegen bindet das Protein PABPC (cytoplasmatic Poly-A-binding protein) und schützt dieses Ende der mRNA vor dem Abbau durch RNAsen [85]. Eine wichtige Funktion von PABPC besteht allerdings auch in der Interaktion mit eIF4G, was zu einer Zirkularisierung der mRNA führt und so die Initiation der Translation fördert, zudem wird durch diesen Vorgang die Affinität zwischen eIF4F und der mRNA erhöht (siehe Abbildung 5) [86].

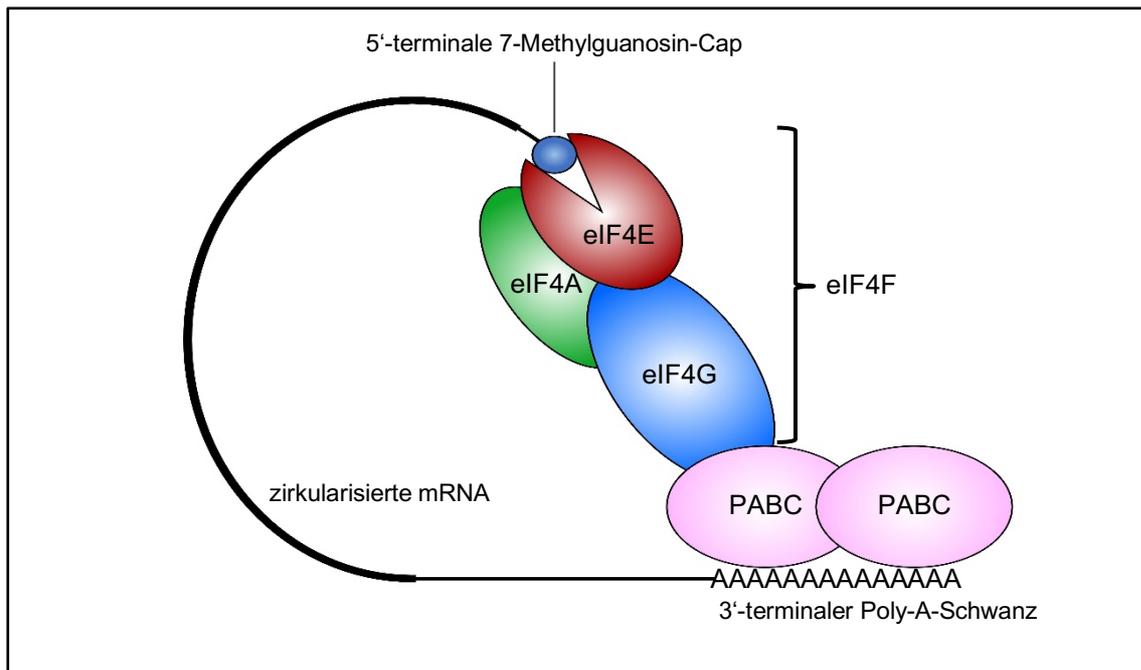


Abbildung 5: Schema einer zirkularisierten mRNA mit Proteinen des Initiationskomplexes. Die Zirkularisierung wird durch Bindung der 5'-terminalen 7-Methylguanosisin-Cap an PABC, welches wiederum an eIF4G gebunden ist, sowie Bindung des 3'-terminalen Poly-A-Schwanzes an eIF4E erreicht. eIF4G und eIF4E bilden mit eIF4A den Proteinkomplex eIF4F (Abbildung nach [80], modifiziert).

Aus den vorgestellten Prozessen wird ersichtlich, dass einerseits die mRNA selbst durch die 3'- bzw. 5'-terminalen Strukturen und deren Rolle für die Initiation der Translation ein geeignetes Ziel für die miRISC-vermittelte Interaktion darstellt. Andererseits ist erkennbar, dass eine Inhibition der an dem Aufbau des Initiationskomplexes beteiligten Proteine zu einer ähnlichen Depression der Translation führen kann.

1.1.4.3 Mechanismus der Repression nach Translationsinitiation

Bereits zu Beginn der Forschung auf dem Feld der microRNA zeigten Expressionsanalysen von lin-14 und lin-28, beides Ziel-mRNA der microRNA lin-4 im Nematoden *C. elegans*, dass diese zwar an ihre jeweiligen Polysomen gebunden waren, eine effektive Translation allerdings auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte [87, 88]. Andere Studien kamen in weiteren Spezies zu ähnlichen Ergebnissen und zeigten zudem, dass die Zielsequenzen der microRNA in translatierten Regionen lagen [89–91]. Der genaue Mechanismus der Interaktion zwischen microRNA und Polysomen ist noch unklar, jedoch wird vermutet, dass die naszierende Polypeptidkette entweder cotranslational abgebaut wird [89] oder eine vorzeitige Ablösung der Polysomen von der mRNA zu der Dissoziation von mRNA- und Proteinlevel führt [90].

1.1.4.4 Mechanismus der Repression während der Translationsinitiation

Eine weitere Möglichkeit, wie microRNA nach Bildung des miRISC die Translation hemmen, besteht auf der Ebene der Translationsinitiation. Wie bereits in Kapitel 1.1.4.2 dargestellt, sind für die Bildung eines Initiationskomplexes sowohl die 5'-terminale 7-Methylguanosa-Cap als auch die 3'-terminale Poly-A-Sequenz und hiermit assoziierte Proteine essentiell. Durch Interaktion mit diesen Zielen wird letztendlich auch die repressive Wirkung des miRISC vermittelt.

Ein Austausch der 5'-terminalen 7-Methylguanosa-Cap gegen eine artifizielle, nicht-funktionale Cap-Struktur führte zu einer effektiven Blockade der Translation [92, 93]. Dieser Effekt wird hauptsächlich einer Interferenz des miRISC, respektive der damit assoziierten GW182-Proteinen mit dem für die Initiation der Translation essentiellen Faktor eIF4F zugeschrieben [94, 95]. Passend zu diesen Ergebnissen konnte die microRNA-vermittelte Attenuierung der Translation durch Erhöhung der eIF4F-Konzentration aufgehoben werden [96].

Einen weiteren Angriffspunkt bietet die Interaktion von PABC mit dem 3'-terminalen Poly-A-Schwanz der mRNA. Das Protein PABC weist in seiner N-terminalen Domäne eine Bindungsstelle für eIF4G auf, in der C-terminalen Domäne hingegen befindet sich eine Bindungsstelle für GW182. Es wird vermutet, dass die Interaktion von GW182 mit PABC die Bindung mit eIF4G kompetitiv inhibiert und zudem die Affinität von PABC für den Poly-A-Schwanz reduziert [97–99].

Die Folge dieser Beeinflussung ist zum einen die Aufhebung der PABC-vermittelten Zirkularisierung der mRNA, zum anderen ist der Poly-A-Schwanz der Deadenylierung ausgesetzt, was zusammengefasst zu einer verminderten Translation der entsprechenden mRNA führt.

1.1.4.5 Mechanismus der Degradation der Ziel-mRNA

Wie bereits in Kapitel 1.1.4.1 erwähnt, wird neben der Translationsblockade auch der vollständige Abbau einer Ziel-mRNA durch den miRISC vermittelt. In Pflanzen geschieht dieser Schritt aufgrund vollständiger Basen-Komplementarität zwischen microRNA und mRNA direkt durch die endonukleolytische Funktion des AGO-Proteins.

In Eukaryoten hingegen werden bei dem miRISC-vermittelten Abbau der Ziel-mRNA zwei Wege unterschieden, welche allerdings beide mit einem initialen graduellen Abbau des 3'-terminalen-Poly-A-Schwanzes (Deadenylierung) durch den sogenannten CAF1-CCR4-NOT-Komplex beginnen. Infolge dessen ist entweder ein Abbau der mRNA in 3'-5'-Richtung durch ein Exosom möglich oder es erfolgt zusätzlich eine Entfernung der 5'-terminalen 7-Methylguanosa-Cap (Decapping) durch das Enzym DCP2. Ähnlich wie bei

Repression der Translation sind auch diese beiden Prozessierungen durch miRISC-gebundene GW182-Proteine vermittelt, da der CAF1-CCR4-NOT-Komplex als auch die Decapping-Enzyme Interaktionspartner dieser Proteine sind und so in eine räumliche Nähe zu der mRNA gebracht werden [100–102]. Der finale Abbau der mRNA erfolgt durch exonukleolytischen Abbau in 5'-3'-Richtung, welcher durch das Enzym XRN1 katalysiert wird [103].

In welchem Ausmaß sowohl die Translations-Blockade und der mRNA-Abbau zur microRNA-vermittelten Repression eines Genes beitragen, ist aktuell noch ungeklärt. Proteomanalysen zeigten, dass in Abhängigkeit vom Messzeitpunkt eine Kohärenz zwischen mRNA- und Proteinlevel besteht [104, 105]. Dieses Ergebnis favorisiert einen microRNA-vermittelten Abbau gegenüber der Translationshemmung, konnte aber nicht abschließend klären, ob eine transiente Blockade dem Abbau vorausgeht oder ob die beiden Mechanismen unabhängig voneinander vorliegen. Auch ungeklärt ist bisher die Frage, ob Cofaktoren, welche beispielsweise ebenfalls in der 3'-UTR einer mRNA binden, die weitere Prozessierung beeinflussen. Darüber hinaus wird diskutiert, ob die initiale Hybridisierung zwischen mRNA und microRNA direkte Auswirkungen auf den weiteren Metabolisierungspfad hat [106, 107].

1.2 Leber und Cholestase

1.2.1 Physiologische Grundlagen

Die Leber stellt im Organismus ein Organ mit weitreichenden Funktionen und Aufgaben dar. Neben der Biosynthese von lebenswichtigen Proteinen wie beispielsweise Akute-Phase-Proteinen und Gerinnungsfaktoren ist die Leber auch in Hinblick auf die Homöostase des Glukose-, Fett-, und Eiweißstoffwechsels von zentraler Bedeutung. Die Leber fungiert zudem als exkretorisches Organ und produziert täglich ca. 500 bis 800 ml Gallenflüssigkeit. Die physiologische Funktion dieser Flüssigkeit beinhaltet neben der Ausscheidung von zahlreichen Stoffwechselprodukten die Emulgation von Lipiden und fettlöslichen Vitaminen im Darm. Ferner wird durch die Galle der Magensaft im Duodenum neutralisiert, es werden Pankreasenzyme aktiviert sowie die Darmmotilität angeregt.

Die Leber bildet bis zu 70% der Gallenflüssigkeit (kanalikuläre Galle), welche einerseits ein lipidreiches Sekret wasserlöslicher Stoffe (Gallensalze, Phospholipide, Gluthation, Immunglobuline und Mukus) und andererseits ein Exkret wasserunlöslicher Stoffe (Cholesterin, Bilirubin, Gallensalze, lipophile Medikamente sowie Metalle) darstellt. Die Gallensäuren unterliegen hierbei dem enterohepatischen Kreislauf und gelangen nach Resorption im terminalen Ileum über die Vena portae wieder in die Leber. An der basolateralen Membran erfolgt die Wiederaufnahme über Transporter wie z.B. den NTCP (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide) und OATP (organic-anion transporting-peptide). Auf der kanalikulären Seite finden sich in ähnlicher Weise Transportproteine. Zu nennen sind hier MRP2- (multidrug resistance-associated protein 2) und BSEP- (bile salt export pump) Transporter, welche neben den Gallensäuren die Passage jeglicher lipophilen Verbindungen realisieren.

Die Sekretion von Phospholipiden erfolgt in der menschlichen Leber über einen Transporter mit der Bezeichnung MDR3 (multidrug resistance receptor 2, homolog zu MDR2/ABCB4 in Nagern), welcher von dem Gen ABCB4 kodiert wird. Dieser ist ATP-abhängig und zählt daher zu der Superfamilie der ABC-Proteine (ATP-binding cassette) [108, 109].

Die sezernierten Phospholipide dienen in erster Linie dazu, gemeinsam mit Gallensäuren und Cholesterin gemischte Mizellen zu bilden. Änderungen in der Zusammensetzung im Sinne eines zunehmenden Gallensäure- respektive verminderten Phospholipidanteils führen durch den Einfluss der Detergenzienwirkung der Gallensäuren zu einer Schädigung von Hepato- und Cholangiozyten [110]. Eine Störung der Gallensekretion oder des Gallenabflusses führt zur Akkumulation der toxischen Gallensäuren und Bilirubin in den Hepatozyten und zum klinischen Bild der Cholestase, welche zur Leberschädigung führt.

Je nach Ätiologie wird unterschieden zwischen einer intrahepatischen Cholestase, welche durch eine virale Hepatitis, Giftstoffe oder Medikamente verursacht wird, und einer extrahepatischen Cholestase, welche durch eine mechanische Behinderung des Gallenabflusses, beispielsweise durch Gallensteine oder Tumore, bedingt ist.

1.2.2 Murine Cholestase-Modelle

Es gibt verschiedene Mausmodelle zur Untersuchung cholestatischer Erkrankungen [111]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Mausmodelle verwendet, welche aufgrund unterschiedlicher Pathologien eine Cholestase entwickeln.

Zum einen wurde eine Mauslinie mit dem genetischen Hintergrund BALB/c genutzt, welche einen Knockout für das ABCB4-Gen aufweist und dadurch eine entzündliche sklerosierende Cholangitis mit konsekutiver Cholestase entwickelt.

Das zweite Mausmodell - ebenfalls auf dem genetischen Hintergrund BALB/c - ist transgen für das große Hepatitis-B-Virus-Oberflächenprotein (HBs). Im Hinblick auf die Pathogenese einer chronischen HBV-Infektion ist es ein vielfach verwendetes Modell, das allerdings auch eine cholestatische Komponente entwickelt.

Das dritte verwendete Mausmodell ist ein Hybrid der beiden genannten Modelle. Diese Mäuse weisen sowohl einen Knockout des ABCB4-Gens auf und sind zugleich transgen für HBs. Auch dieses Hybrid-Modell entwickelt eine Cholestase.

1.2.2.1 ABCB4^{-/-}-Mausmodell

Das etablierte ABCB4^{-/-}-Modell bietet die Möglichkeit, die Entwicklung einer sklerosierenden Cholangitis und der Folgeerkrankungen zu untersuchen [112–114]. Durch den Knockout des für den gleichnamigen Lipidtransporter kodierenden ABCB4-Gens ist in der Leber dieser Tiere die Sekretion von Phospholipiden in die Gallengänge blockiert. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigen ABCB4-defiziente Mäuse im ersten Lebensjahr keine Unterschiede in der Entwicklung von Körpergewicht, Körpergröße oder der Mortalität, auch lassen sich keine phänotypischen Unterschiede ausmachen. Postnatal bestehen keine makroskopischen Auffälligkeiten der Leber, auch die Gallengänge zeigen im Vergleich zu Wildtypen keine morphologischen Unterschiede [110, 115].

Die Entwicklung der Canaliculi sistiert allerdings in den folgenden zwei bis drei Wochen, es kommt nicht zur Ausbildung reifer Strukturen [115]. Histologisch zeigt die Leber ABCB4-defizienter Mäuse bereits am Tag nach der Geburt Infiltrate neutrophiler Granulozyten sowie proliferierende Fibroblasten und eine duktiläre Reaktion in den größeren Portalfeldern. Nach zwei Wochen weisen diese Mäuse eine periduktale Fibrose der

mittleren und großen Gallengänge auf [116]. In der Folge entwickeln die Tiere eine ausgeprägte Gallengangsschädigung mit sowohl mikroskopischen als auch makroskopischen Merkmalen einer sklerosierenden Cholangitis und konsekutiver hepatischen Fibrose [110, 117]. Die erniedrigte Phospholipidkonzentration in der Galle bedingt zusätzlich eine ausgeprägte Cholestase, die auf die verminderte Löslichkeit von Cholesterin zurückzuführen ist [118]. Die dauerhafte chronische Inflammation führt ab einem Alter von vier bis sechs Monaten zu der Entwicklung von hepatozellulären und Cholangio-Karzinomen [110, 119, 120], darüber hinaus wurden in diesem Modell pulmonale Metastasen beschrieben (siehe Abbildung 6).

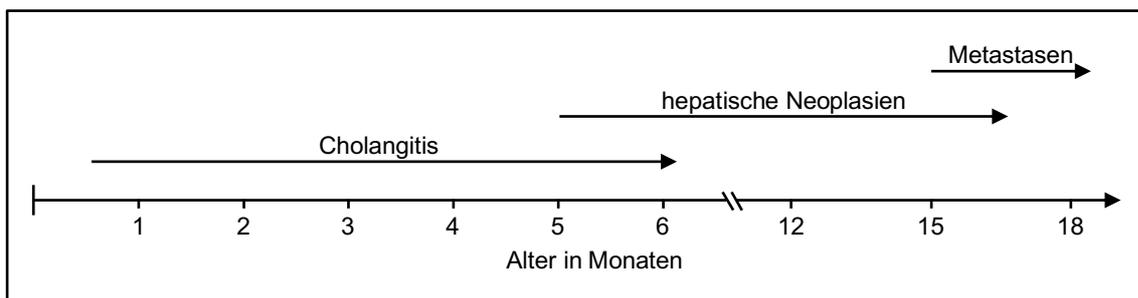


Abbildung 6: Darstellung der im ABCB4^{-/-}-Modell auftretenden Leberpathologien im zeitlichen Verlauf. (Abbildung nach [115], modifiziert)

Die Relevanz des ABCB4^{-/-}-Modells besteht darin, dass zahlreiche Lebererkrankungen des Menschen mit einem Defekt des von diesem Gen kodierten MDR3-Proteins assoziiert sind. Beschrieben wurden in diesem Zusammenhang mehrere Krankheiten [121]. Der Subtyp 3 der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase (PFIC3), eine Erkrankung, welche mit einer neonatalen Cholestase beginnt und über die Entwicklung einer Leberfibrose zum konsekutiven Leberversagen meist vor dem Erreichen des Erwachsenenalters führt, ist auf eine Mutation des ABCB4-Gens zurückzuführen [122, 123]. In vielen dieser Krankheitsfälle besteht die einzige kurative Therapie in der Lebertransplantation. Darüber hinaus kann ein Defekt des MDR3-Proteins zu einer intrahepatischen Schwangerschaftscholestase, zu multiplen Steinleiden sowie zu einer sklerosierenden Cholangitis oder der primär-biliären Cholangitis (PBC) führen [124–127]. Zudem scheinen bestimmte Polymorphismen des MDR3-Proteins prädisponierend für die Entwicklung einer cholestatischen Lebererkrankung zu sein [128, 129].

1.2.3 Expressionsänderungen von microRNA in cholestatischen Lebererkrankungen

Bisher existieren nur wenige publizierte Arbeiten mit Expressionsanalysen von microRNA in ABCB4^{-/-}-Mäusen. Eine dieser Studien zeigte, dass miR-873-5p in Patienten mit Leberzirrhose vermehrt exprimiert wird. Als mögliches Ziel dieser mRNA wurde die hepatische Methyltransferase GNMT identifiziert, welche in Erkrankungen wie NAFLD (nicht-alkoholische Lebererkrankung), Leberfibrose, -zirrhose und HCC vermindert vorliegt. Nach Inhibition von miR-873-5p in vier Monate alten ABCB4^{-/-}-defizienten Mäusen wurde ein erhöhtes Vorkommen von GNMT beobachtet, was mit niedrigeren Serumtransaminasen, niedrigerer Gallensäurekonzentration sowie verminderter Entzündungsreaktion, Fibrosierung und Zelltod einherging [130].

Abseits des ABCB4^{-/-}-Modells gibt es eine Vielzahl von Studien mit Verwendung anderer Tiermodelle, die sich mit der Regulation dieser RNA-Moleküle im Rahmen von cholestatischen Lebererkrankungen, Gallensäuren-assoziierten Leberschädigungen und den Folgeerkrankungen beschäftigt haben. Ein Beispiel für eine regulierte microRNA im Rahmen einer cholestatischen Erkrankung ist die leberspezifische miR-122. Diese wird in Hepatozyten stark exprimiert, sodass sie 70% der Gesamt-microRNA der Leber ausmacht. Neben ihrer Rolle in der Regulation von Zellreifung und neoplastischer Transformation nimmt diese microRNA auch Einfluss auf die Stoffwechselprozesse der Leber. Eine Änderung der Expression dieser microRNA wurde auch bei Cholestase beobachtet [131]. Als potenzielles Ziel von miR-122 wurde mit CYP7A1 (Cholesterol-7-alpha-hydroxylase) ein zentrales Enzym der Gallensäuresynthese identifiziert [132], welches hierdurch gehemmt wird. Zugleich wird die Sekretion von Gallensäuren auf der kanalikulären Seite der Hepatozyten durch Interaktion von miR-33 mit der mRNA der Transportproteine ABCB11 sowie ATP8B1 blockiert [133]. Interessanterweise wird miR-33 in Abhängigkeit von der CYP7a1-Aktivität exprimiert, was für eine Synergie der microRNA-vermittelten Effekte und damit für eine mögliche miR-33-CYP7a1-Achse spricht [134]. Eine zentrale Rolle mit komplexen Funktionen während einer cholestatischen Erkrankung spielt auch der nukleäre Rezeptor FXR (Farnesoid-X-Rezeptor). Dieser fungiert als eine Art Sensor für die intrazelluläre Gallensäurekonzentration und wirkt regulatorisch auf die Syntheseleistung der Hepatozyten. Bei einer entsprechenden Aktivierung transloziert FXR in den Zellkern, bewirkt eine Änderung der Genexpression und ist in der Lage, die Gallenhomöostase zu steuern [135]. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass FXR einerseits selbst ein Ziel für die Interaktion mit microRNA darstellt, andererseits ist dieser Faktor durch seinen Effekt auf die Gentranskription wiederum ein wichtiger Regulator von microRNA. Ferner scheint FXR eine Rolle in der Progression

zum hepatozellulären Karzinom innezuhaben, da miR-421 zur verminderten Expression dieses Rezeptors führt und somit zur Tumorentwicklung beiträgt [136].

De Aguiar et al. konnten zeigen, dass miR-144 durch FXR kontrolliert wird und daraufhin über Interaktion mit der mRNA des ABCB1-Transporters die plasmatische HDL-Konzentration reguliert [137]. Weitere Beispiele für die FXR-abhängige Regulation sind die vermehrten Expressionen von miR-34a, welches durch Interaktion mit der Deacetylase SIRT1 proapoptotische Effekte vermittelt. MiR-29a werden antifibrotische Wirkungen im Rahmen einer Cholestase-induzierten Leberfibrose zugesprochen [138, 139]. Durch verminderte Expression von miR-199a-3p, ebenfalls FXR-abhängig, wird der Tumorsuppressor STK11 vermehrt exprimiert und ebenfalls eine protektive Wirkung erzielt [140].

MiR-199a-5p hingegen wirkt dem Cholestase-vermittelten ER-Stress entgegen, indem es die Translation der in diesem Signalweg essenziellen Proteine GRP78 (glucose-regulated-protein) und ATF6 (activating transcription factor 6) blockiert. Zudem wurde gezeigt, dass diese microRNA während einer Leberschädigung durch die Aktivierung von hepatischen Sternzellen profibrotisch wirkt [141, 142].

Neben ihrer funktionellen Bedeutung wurde den microRNA in den letzten Jahren zunehmende Beachtung als Biomarker beigemessen. In Rattenversuchen mit verschiedenen cholestaten Leberpathologien wurden mit let-7i, let-7b, miR-17-3p, miR-27b, miR-99a, miR-130b, miR-185, miR-361, miR-377, miR-872, miR-24-1, miR-218-1, miR-337-3p, miR-351, miR-411, miR-699, miR-704, miR-190 und miR-743b mögliche Kandidaten identifiziert, welche in ihrer Expression gleichsinnig vermindert waren [143]. Ähnliche Untersuchungen wurden auch in murinen Modellen mit Gallengangsligatur durchgeführt. Die entsprechenden Analysen identifizierten die in ihrer Expression verstärkten let-7a, let-7d, let-7f, let-7g, miR-21, miR-125a-5p, miR-125b-5p, miR-194, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-214, miR-221 sowie miR-486 als mögliche Biomarker im Rahmen einer obstruktiven Cholestase [144].

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die biologische Funktion von microRNA im Rahmen von cholestaten Lebererkrankungen bisher lediglich partiell verstanden ist. Dies ist zum einen der Tatsache geschuldet, dass längst nicht alle microRNA mit einer möglichen Rolle in diesen Erkrankungen beschrieben wurden, zum anderen ist die exakte Funktion jeder einzelnen microRNA durch zahlreiche Interaktionen mit Zielsequenzen äußerst komplex. In dieser Hinsicht sind weitere Untersuchungen erforderlich.

1.3 Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) gehört zur Virusfamilie der Hepadnaviridae und ist der bekannteste Vertreter der Subgruppe der Orthohepadnaviren, welche Säugetiere infizieren. Die Aufnahme des DNA-Virus erfolgt entweder parenteral oder perinatal über den Kontakt mit erregerrhaltigem Blut und anderen Körperflüssigkeiten. Die Infektion verläuft bei Erwachsenen häufig klinisch stumm oder mit subklinischen, unspezifischen Beschwerden. Lediglich ein Drittel dieser Altersgruppe entwickelt Symptome einer akuten ikterischen Hepatitis, der Verlauf mit Leberversagen tritt sehr selten auf. Meist heilt eine HBV-Infektion folgenlos aus und hinterlässt eine lebenslange Immunität, allerdings entwickeln 5 % der Erwachsenen und 95 % der Kinder nach Infektion eine chronische Verlaufsform. Die Hepatitis-B-Infektion ist eine der häufigsten Infektionskrankheiten der heutigen Zeit: Nach Schätzungen der WHO haben weltweit mehr als zwei Milliarden Menschen eine HBV-Infektion durchgemacht, zudem gibt es 257 Millionen chronisch Infizierte [145].

Im Hinblick auf Folgeerkrankungen der chronischen Hepatitis-B-Infektion wird angenommen, dass ein Drittel aller Fälle von Leberzirrhose sowie mehr als die Hälfte der hepatzellulären Karzinome (HCC) auf diese Erkrankung zurückzuführen sind [146]. Pro Jahr versterben rund 887.000 Patienten an HBV und den Folgeerkrankungen [145]. Eine Impfung gegen das Virus wurde in den 1970ern entwickelt und 1981 von der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zugelassen [147–149].

1.3.1 Aufbau des Hepatitis-B-Virus

Das Hepatitis-B-Virus wurde erstmals Ende der 1960er Jahre beschrieben [150]. Es besitzt einen sphärischen Aufbau mit einem Durchmesser von 42 - 47 nm und wird auch als Dane-Partikel bezeichnet [151]. Strukturell besteht die Hülle aus Lipiden und insgesamt drei verschiedenen Formen des Oberflächenproteins HBs (small, medium und large Hepatitis-B-Surface-Protein). Die Proteinhülle umschließt ein ikosaedrisches, 22-25 nm messendes Kapsid, welches von dem Protein HBc gebildet wird. Das Kapsid enthält die DNA sowie eine virale Polymerase. Neben diesen infektiösen Virionen gibt es noch pleomorphe Formen, welche entweder tubuläre oder sphärische Gestalt haben. Diese als SVP (subviral envelope particle) bezeichneten Partikel sind nicht infektiös, da sie kein Kapsid enthalten. Zudem unterscheiden sie sich von den Dane-Partikeln durch die Bestandteile ihrer Hüllmembran [152]. Das Verhältnis von infektiösen zu nicht-infektiösen Partikeln im Blut von HBV-Infizierten beträgt ca. 1:1000. Aus diesem Grund wird

vermutet, dass diese Partikel eine Art virales Abwehrsystem darstellen, welches das Immunsystem ablenkt und durch diesen Mechanismus die infektiösen Partikel vor dem körpereigenen Immunsystem schützt [153].

Das Genom des Hepatitis-B-Virus ist je nach Subtyp mit 3100 bis 3300 Basenpaaren relativ klein und in einer partiell doppelsträngigen DNA organisiert. Diese codiert für insgesamt sieben virale Proteine: drei verschiedene Oberflächenproteine (SHBs, MHBs und LHBs), eine virale Polymerase, zwei Kapsidproteine (HBc und HBe) sowie HBx, dem eine Rolle in der Karzinogenese zugesprochen wird [154]. Die geringe Genomgröße wird durch vier Leserahmen erreicht, über die Hälfte der Nukleotide befinden sich in mehr als einem Gen [108].

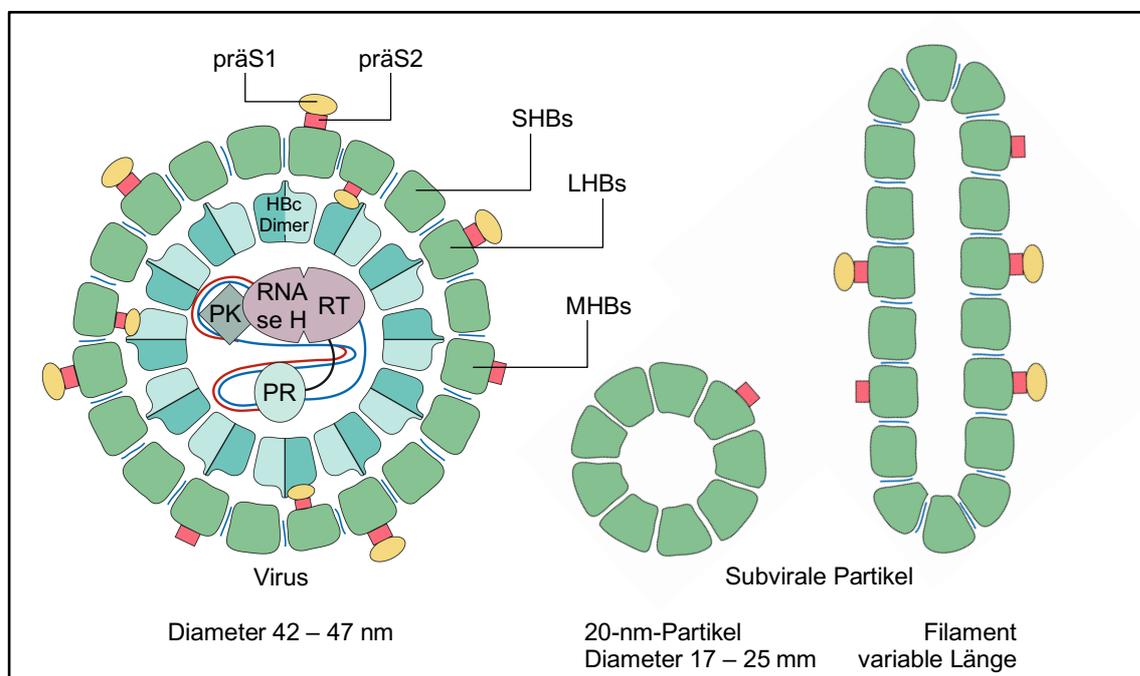


Abbildung 7: Strukturmodell des HBV-Virions und der subviralen Partikel. Dargestellt sind die drei unterschiedlichen Hüllproteine SHBs, MHBs, LHBs sowie das Core-Protein HBc, die reverse Transkriptase RT und die kovalent an die DNA gebundene Primerdomäne PR. Die Hüllproteine enthalten zum Teil die präS2- bzw. präS1-Domäne. Abbildung nach [155], modifiziert.

1.3.2 Replikation des Hepatitis-B-Virus

Die Replikation des Hepatitis-B-Virus findet aufgrund des Hepatotropismus ausschließlich in den Hepatozyten des Wirtsorganismus statt. Zunächst bindet das Virus über die aminoterminalen präS1-Domänen des LHBs an den NTCP-Transporter der basolateralen Zellmembran [156]. Es erfolgt die Freisetzung des Kapsids, welches Microtubuli-vermittelt zum Zellkern transportiert wird, daraufhin gelangt die HBV-DNA über Kernporen

in den Zellkern. In den nachfolgenden Schritten wird die HBV-DNA durch die zelleigene DNA-Polymerase zunächst zur cccDNA (covalently closed circular DNA) vervollständigt und anschließend durch die RNA-Polymerase-III zur viralen prägenomischen, precore und zu drei subgenomischen RNA transkribiert. Die prägenomische RNA dient als Matrize für die spätere reverse Transkription und zugleich als mRNA für das virale Kapsid sowie die virale reverse Transkriptase. Die precore-RNA codiert für das virale HBe, welches, ähnlich wie die drei unterschiedlichen Oberflächenproteine, für die jeweils eine subgenomische RNA codiert, direkt an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums translatiert wird [157]. Die prägenomische RNA hingegen wird gemeinsam mit der viralen Polymerase in neu formierte HBV-Kapside eingebaut. Es erfolgt die Synthese eines Komplementärstranges (Minusstrang), welcher nach Abbau der Matrize durch die RNase-H-Funktion der Polymerase als Vorlage für den Plusstrang dient. Nach dem Abschluss dieser Syntheseschritte bildet das Genom eine zirkuläre Form und wird am 5'-Ende des Plusstranges noch weiter prozessiert, wodurch das Endprodukt, die rcDNA (capsid-associated relaxed circular DNA) entsteht [108, 152].

Die HBV-DNA-enthaltenden Kapside können anschließend entweder in den Nucleus reimportiert werden, was eine Amplifikation der cccDNA zur Folge hat, oder am Endoplasmatischen Retikulum in Hüllmembranen verpackt und über den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust werden [158].

1.3.3 Verlaufsformen der Hepatitis-B-Virusinfektion

1.3.3.1 Akute Virushepatitis

Die akute Virushepatitis wird 60-120 Tage nach Infektion mit HBV hauptsächlich von dem wirtseigenen Immunsystem ausgelöst, das Virus selbst ist nicht zytopathogen [159]. Virusinfizierte Hepatozyten präsentieren auf ihrer Oberfläche HBV-Epitope mittels MHC1-Rezeptoren, welche von CD8⁺-Lymphozyten erkannt werden. Diese sind in der Lage, befallene Zellen über direkt-zytolytische Effekte und zusätzlich durch indirekte Mechanismen wie beispielsweise über die Produktion von antiviralen und pro-inflammatorischen Zytokinen anzugreifen [160]. Das Resultat dieser Reaktion ist einerseits die Schädigung der Leber, andererseits wird dadurch aber auch das Virus, respektive die virale cccDNA in den Hepatozyten, erfolgreich zerstört [161].

Die Erkrankung verläuft phasenweise und beginnt mit dem Prodromalstadium, welches durch unspezifische Symptome wie Appetitlosigkeit, Gelenkschmerzen, Unwohlsein, Übelkeit, Erbrechen und Fieber gekennzeichnet ist. Nach drei bis zehn Tagen folgt die ikterische Phase, der Urin färbt sich dunkel, der Stuhl ist acholisch, ein Ikterus tritt auf. Diese Phase erreicht nach ein bis zwei Wochen ihren Höhepunkt und klingt in den darauffolgenden vier Wochen wieder ab [162]. Eine fulminante Virushepatitis entwickelt sich in äußerst wenigen Fällen. Diese imponiert durch den plötzlichen Beginn und dem Auftreten von hohem Fieber, abdominalen Schmerzen und Erbrechen, gefolgt von Leberversagen und komatösen Zuständen [163].

1.3.3.2 Chronische Virushepatitis

Gelingt es dem Immunsystem nicht, das Virus erfolgreich zu eliminieren und ist das virale HBs nach sechs Monaten noch im Patientenserum nachweisbar, spricht man definitionsgemäß von einer chronischen Hepatitis B. Generell gilt, je jünger der Patient, umso höher ist das Risiko für die Entwicklung dieser Verlaufsform [164]. In diesem Alter findet sich eine qualitativ und quantitativ geringere Immunreaktion gegen das HBV. Die Gründe hierfür sind größtenteils noch unverstanden, jedoch wird gerade bei perinatal infizierten Kindern eine fehlende Identifikation der viralen Bestandteile als Fremdprotein diskutiert, die anstelle einer Immunabwehr eine immunologische Toleranz zur Folge hat [165]. Eine weitere Erklärung für die insuffiziente Abwehr könnte darin bestehen, dass die nichtinfektiösen Partikel die gegen das HBs gerichteten Antikörper neutralisieren. Auch Mutationen des viralen Genoms, durch welche sich das Virus der Erkennung durch das Immunsystem entziehen könnte, werden aktuell in Betracht gezogen [166].

Die chronische HBV-Infektion kann jahrelang asymptomatisch verlaufen. Auch hier treten unspezifische Beschwerden wie Müdigkeit, Leistungsknick, Appetitlosigkeit und Glieder- und Muskelschmerzen auf. Im Falle eines prolongierten Verlaufs finden sich unter Umständen Leberhautzeichen wie beispielsweise Spider-Naevi, Palmarerytheme, Teleangiectasien oder Dupuytren'sche Kontraktionen. Die Diagnose der chronischen Hepatitis B ist häufig ein Zufallsbefund [162].

Infolge einer chronischen Hepatitis B können eine Leberzirrhose oder ein Leberzellkarzinom entstehen. Das Risiko einer Leberzirrhose wird je nach Vorkommen von HBe im Serum auf 2,5% – 10% pro Jahr geschätzt. Die chronische HBV-Infektion erhöht zudem das Risiko für die Entstehung eines Leberzellkarzinoms (HCC) gegenüber der Normalbevölkerung um den Faktor 10: Im Falle einer bestehenden Leberzirrhose beträgt das Risiko eines Leberzellkarzinoms 2% – 7% pro Jahr, während dieses ohne zugrundeliegende Zirrhose deutlich seltener auftritt (0,1% – 0,6% pro Jahr) [167]. Zu erwähnen ist in diesem Kontext die direkte karzinogene Potenz des Hepatitis-B-Virus. In Patienten mit chronischer HBV-Infektion kommt es auch ohne Entzündungsreaktion, Leberschädigung oder Zirrhose zur HCC-Formation [168]. Die zugrundeliegenden Mechanismen beinhalten unter anderem eine Integration der viralen DNA in das Wirts-Genom der Hepatozyten, was mit DNA-Mikrodeletionen assoziiert ist und so Tumor-relevante Gene beeinflusst [169]. Darüber hinaus spielt HBx als Aktivator mehrerer Wachstums-relevanter Gene und durch direkte Interaktion und Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 eine entscheidende Rolle in der Tumorbildung. [170]

1.3.4 Modell der HBs-transgenen Maus

Um die Pathogenese einer Infektion durch das humane Hepatitis-B-Virus zu verstehen, werden Tiermodelle benötigt, welche HBV-assoziierte Lebererkrankungen adäquat darstellen. Die Auswahl solcher Tiere ist allerdings beschränkt, da das humane Hepatitis-B-Virus neben dem Menschen lediglich Schimpansen und bis zu einem gewissen Grad auch Tupaias infiziert [171, 172]. Diese Säuger stellen die einzigen natürlichen, vollwertigen Tiermodelle dar, welche die Erforschung der Infektion, der Replikation sowie die Entwicklung der HBV-assoziierten Erkrankungen ermöglicht.

Die Verwendung von Schimpansen ist ethisch jedoch problematisch und mit hohen Kosten verbunden. Tupaias hingegen sind schwierig zu halten und verhältnismäßig groß, zudem ist die Infektion mit HBV lediglich transient und trotz Sekretion von HBs und konsekutiver Produktion von Antikörpern verhältnismäßig milde ausgeprägt [172]. Grundlegende Schritte der Replikation und der hepatischen Kanzerogenese wurden zwar durch Studien mit HBV-verwandten Viren, welche ebenfalls zu der Familie der Hepadnaviren

gehören, wie beispielsweise das Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV, 40% Nukleotid-Homologie zu HBV) oder das Hepatitis-B-Virus des Waldmurmeltieres (WHV, 70% Nukleotid-Homologie zu HBV) verstanden [173–175]. Diese Modelle dienten zur Entwicklung neuer Impfstoffe und antiviraler Therapieformen [176, 177], jedoch erscheinen diese insbesondere zum Verständnis der frühen Schritte einer HBV-Infektion ungeeignet, da die Oberflächenproteine deutliche Unterschiede aufweisen. Hinzu kommt, dass die Waldmurmeltiere in der Wildbahn gefangen werden, oft unter parasitären Infektionen leiden, eine Vielzahl von Einflussfaktoren nicht kontrollierbar ist und die Tiere genetisch nicht vollständig sequenziert sind [178].

Als ebenfalls unzureichend erwiesen sich Zellversuche. Zwar gelang die Anzucht von HBV in primären Hepatozyten-Kulturen, allerdings entdifferenzieren diese Zellen nach einiger Zeit und eignen sich aus diesem Grund nicht für Langzeitstudien [179, 180]. Zusätzlich ist die Übertragung einer in-vitro-Studie auf in-vivo-Modelle problematisch, da Zellen in Kultur sich anders verhalten als Hepatozyten in einem Zellverband mit regelrechter dreidimensionaler Struktur und intakter Interaktion mit nichtparenchymatösen Zellen [181].

Aus den oben genannten Gründen fokussierte man sich auf die Entwicklung geeigneter Mausmodelle, da diese genetisch und immunologisch vollständig bekannt, einfach zu züchten und zu halten sind. Jedoch ist eine Infektion mit humanen HBV nicht möglich, da murine Hepatozyten den für die Aufnahme des Virus benötigten NTCP-Rezeptor nicht exprimieren und im Falle einer Transfizierung mit humanem NTCP die Zellen zwar mit HBV infiziert werden, allerdings keine virale Replikation stattfindet [156, 182].

Chisari et al. gelang 1985 die Mikroinjektion von subgenomischen HBV-DNA-Fragmenten in Mäuse (C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J) [183]. Die Fragmente enthielten die genetische Information für die viralen Proteine SHBs, MHBs, LHBs sowie HBx. Mithilfe eines leberspezifischen Albuminpromoters wurden diese Gene exprimiert, die entsprechenden Proteine in den murinen Hepatozyten synthetisiert und HBs sowie SVPs sezerniert. Durch dieses Modell konnten Synthese, Transport und Sekretion der viralen Antigene analysiert werden. Eine Limitation ergibt sich dadurch, dass das Transgen während der Embryogenese eingebracht wurde, denn aus diesem Grund sind die Tiere immun gegen die viralen Proteine und bilden keine Antikörper.

Die überschießende Synthese von HBs führt zu einer Ansammlung dieser Proteine im Endoplasmatischen Retikulum. Die Akkumulation ist toxisch und bewirkt eine Schwellung der infizierten Hepatozyten, welche morphologische Ähnlichkeiten mit sogenannten Milchglashepatozyten im Rahmen einer chronischen HBV-Infektion aufweisen [184–186]. Letztendlich führt die Akkumulation von HBs zum Zelltod und damit zur Hepatozel-

lulären Schädigung, welche histologisch durch Nekrosen sowie inflammatorische Infiltrate gekennzeichnet ist. Der ständige Prozess von hepatischer Inflammation, Nekrose sowie Regeneration führt zur chronischen Hepatitis und begünstigt darüber hinaus die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen [187]. Die zeitliche Abfolge der hepatischen Pathologien ist in Abbildung 8 dargestellt.

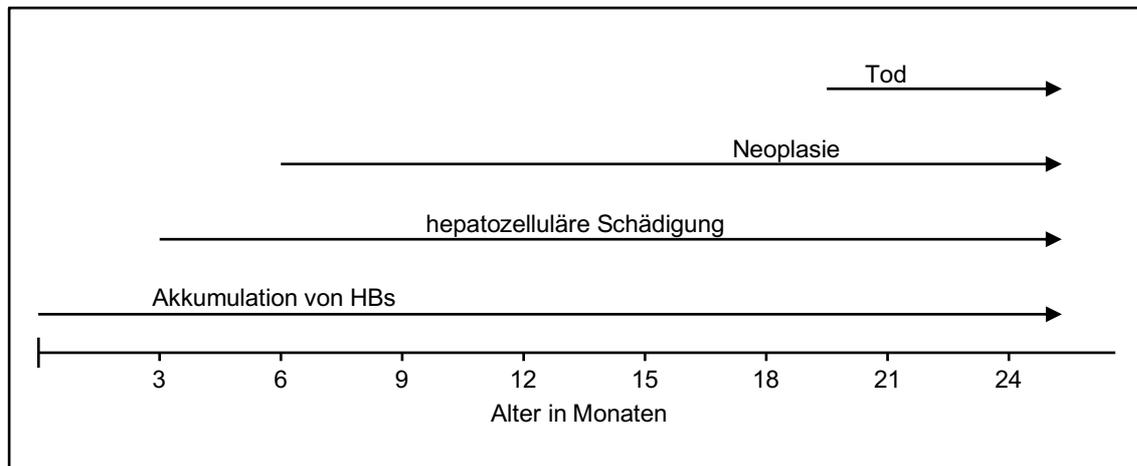


Abbildung 8: Zeitliche Abfolge der hepatischen Schädigung in Mäusen des Stammes C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J.

Bereits nach Geburt der Mäuse akkumuliert HBs in den Hepatozyten und führt nach drei Monaten zur hepatozellulären Schädigung. Nach weiteren drei Monaten treten Neoplasien auf (Abbildung nach [187], modifiziert).

1.3.5 Expressionsänderungen von microRNA bei Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus

Die Expressionsänderung von microRNA im Rahmen einer akuten als auch chronischen HBV-Infektion und in HBV-assoziierten Erkrankungen war Gegenstand in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten.

Obwohl das Genom des Hepatitis-B-Virus in Form einer DNA organisiert ist, wurde bisher keine Virus-eigene microRNA identifiziert [42, 188]. Im Umkehrschluss legt dies nahe, dass das Virus wirtseigene microRNA nutzen könnte, um Infektions-assoziierte Effekte zu vermitteln. Demgegenüber steht die Antwort des Wirtsorganismus, in welcher microRNA ebenso eine Rolle zu spielen scheinen. Wie genau das Virus die microRNA „rekrutiert“, ist noch ungeklärt.

Eine im Zusammenhang mit einer HBV-Infektion mitunter am ausführlichsten untersuchten microRNA ist die leberspezifische miR-122 [189], welche im Rahmen einer HBV-Infektion reguliert wird [190]. Chen et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die prägenomische RNA von HBV eine hochkonservierte Sequenz aufweist, an welche miR-122

bindet und dadurch die Genexpression respektive die Replikation inhibiert. MiR-122 führt so zur verminderten Expression des für die virale Polymerase codierenden Gens [191]. Darüber hinaus ist insbesondere das Protein HBx für die Regulation von microRNA während einer HBV-Infektion von Bedeutung. Song et al. publizierten, dass HBx über eine Interaktion mit PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) indirekt die Expression von miR-122 vermindert und damit die Replikation des Virus fördert [192, 193]. Wang et al. kamen zu dem Ergebnis, dass HBx durch Expressionsminderung von Vertretern der let-7-Familie die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 fördert, welcher wiederum eine Rolle in der Entstehung multipler Tumorerkrankungen spielt [194–196]. Eine ähnliche Bedeutung wird der HBx-bedingten negativen Regulation von miR-101 und der tumorsuppressiv wirkenden miR-205 zugesprochen [197, 198]. Auch miR-501 steht unter dem Einfluss von HBx. Eine verstärkte Expression dieser microRNA bewirkt die Blockade von HBXIP (Hepatitis B virus X-interacting protein), welches die virale Replikation hemmt [199]. Synergistisch zu den genannten microRNA scheint miR-1 zu wirken, welches durch Expressionsminderung von HDAC4 (histone deacetylase 4) eine verstärkte Transkription des HBc-Proteins bewirken und zusätzlich dem repressiven Effekt von miR-122 entgegenwirken soll [200–202]. Eine weitere Möglichkeit, die Transkription der HBV-DNA zu induzieren, besteht in der verstärkten Expression von miR-372 und miR-373, welche den nukleären Faktor I/B beeinflussen [203].

Im Verlauf der chronischen Hepatitis B erreicht das Virus eine inaktive Phase und entgeht so der Erkennung und damit der aktiven Bekämpfung durch das Immunsystem des Wirts. Die Funktion verschiedener microRNA in Zusammenhang mit dieser Phase ist noch nicht vollständig entschlüsselt. Es gibt zahlreiche microRNA wie beispielsweise miR-125a-5p, miR-199a-3p, oder miR-210, welche die Translation der HBV-Oberflächenproteine inhibieren oder, wie miR-152, unter dem Einfluss von HBx die Aktivität von DNA-Methyltransferasen steigern und dadurch die virale Genexpression blockieren [204–206]. Ob diese Expressionsänderungen einen antiviralen Mechanismus darstellen oder lediglich durch das Virus verwendet werden, um die inaktiven Status aufrechtzuerhalten, ist unklar.

Im Rahmen einer HBV-assoziierten Leberfibrose scheinen Vertreter der miR-29-Familie eine zentrale Rolle zu spielen. Ura et al. zeigten, dass miR-29c während der chronischen HBV-Infektion vermindert exprimiert wurde [207]. In Zusammenschau mit einer Studie von Roderburg et al., welche in Mäusemodellen mit CCl $_4$ -induzierter Leberfibrose ebenfalls eine Suppression von Vertretern der miRNA-29-Familie beobachteten, spricht dies für eine mögliche Rolle dieser microRNA in der Entstehung der hepatischen Fibrose [208].

In der Entwicklung des hepatozellulären Karzinoms spielt der miR-17-92-Cluster sowie miR-21 eine zentrale Rolle. Der Cluster besteht aus sechs verschiedenen microRNA (miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a sowie miR-92a-1), interagiert mit den Transkriptionsfaktoren E2F1 bzw. C/EBP β und wurde bereits mit weiteren malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Conolly et al. wiesen eine Hochregulation dieses Clusters auch in HCC nach [209].

Die bisherigen microRNA-Expressionsanalysen zeigen, dass eine Vielzahl dieser RNA-Moleküle in der Pathogenese einer HBV-Infektion involviert ist. Jedoch sind auch in diesem Zusammenhang die exakte biologische Funktion und viele der von microRNA vermittelten Effekte unklar. Geschuldet ist dies zunächst den zahlreichen Zielsequenzen jeder einzelnen microRNA und der damit verbundenen Komplexität einer Expressionsänderung. Zudem werden wahrscheinlich während einer viralen Infektion wirtseigene microRNA durch den Erreger rekrutiert, um beispielsweise die Infektion zu erleichtern, die Replikation zu fördern oder um das Immunsystem des Wirts zu modulieren. Aufgrund dieser Interaktionen ist die Klasse der microRNA für das Verständnis einer HBV-Infektion und der damit assoziierten Erkrankungen essentiell.

2

2 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, eine Expressionsanalyse von microRNA in unterschiedlichen Mausmodellen mit Cholestase und vermehrter Expression des HBs durchzuführen, um so Rückschlüsse auf die Funktion dieser RNA-Partikel im Hinblick auf die Pathogenese, Aufrechterhaltung und Modulation dieser Erkrankungen zu ziehen. Sowohl die Funktion als auch die Regulationsmechanismen von microRNA sind zum aktuellen Zeitpunkt größtenteils unverstanden - jedoch wird dieser Klasse eine bedeutende Rolle sowohl in der Entstehung als auch in der Modulation von Erkrankungen zugeschrieben. Im Umkehrschluss bedeutet das Verständnis von microRNA möglicherweise eine potente Interventionsmöglichkeit für die pharmakologische Therapie während einer cholestatischen Erkrankung

Ein Großteil der bisher durchgeführten microRNA-Expressionsanalysen stützt sich auf die Verwendung von in-vitro-Verfahren, welche eine begrenzte Übertragbarkeit auf in-vivo-Modell aufweisen. Hinzu kommt, dass in-vitro-Versuche lediglich eine Momentaufnahme einer Erkrankung abbilden und diese aus diesem Grund nur unzureichend darstellen können.

In der vorliegenden Arbeit wird eine microRNA-Expressionsanalyse in der Leber von ABCB4-defizienten Mäusen im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen vorgenommen. Darüber hinaus werden Änderungen von microRNA-Expression in der Leber HBV-transgener Mäuse im Alter von 8, 26 und 52 Wochen analysiert. Zusätzlich zu den genannten Tiermodellen wird im Alter von 8, 16 und 52 Wochen das Expressionsmuster von microRNA in der Leber eines Hybridmodells, welches eine ABCB4-Defizienz und HBV-transgen ist, untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse werden miteinander abgeglichen und sollen auf diese Weise der Identifizierung von regulierten microRNA im Rahmen einer cholestatischen Lebererkrankung dienen.

3

3 Ergebnisse

3.1 Array-Analysen in Lebergewebe von weiblichen HBVTg-*ABCB4*^{-/-}-Mäusen im Alter von 16 Wochen

Um einen Überblick zu erhalten, welche microRNA in den unterschiedlichen Mausmodellen einer Regulation unterliegen, erfolgten zunächst Array-Analysen.

Diese Methode ermöglicht, mehrere hundert verschiedene microRNA-Sequenzen zu erfassen und ist daher insbesondere als Screeningverfahren geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein PCR-Array der Firma Qiagen durchgeführt, eine weitere Analyse erfolgte mittels micro-Array, durchgeführt von einem externen Dienstleister. Als Probenmaterial für beide Arrays dienten gepoolte Proben von weiblichen Hybridmäusen (*HBVTg-ABCB4*^{-/-}) und den korrespondierenden Wildtypen mit dem genetischen Hintergrund BALB/c im Alter von 16 Wochen. Die Ergebnisse sind nachfolgend aufgeführt.

3.1.1 Ergebnisse des microRNA-PCR-Array

Der miFinder PCR-Array ermöglicht die Analyse von insgesamt 84 verschiedenen microRNA auf einer 96-Well-Platte. Zusätzlich dienen 12 verschiedene microRNA als Referenz. Weitere Informationen sowie eine detaillierte Beschreibung des PCR-Arrays befinden sich in Kapitel 5.3.6.1.

Für die weiterführende Analyse einer jeweiligen microRNA wurden folgende Kriterien festgelegt:

- 1) Im Falle eines Ct-Wertes ≤ 30 der jeweiligen microRNA in einer der beiden Vergleichsgruppen und zugleich einem Ct-Wert ≤ 30 in der jeweils anderen Gruppe ist eine Auswertung der Daten möglich.

- 2) Bei Ct-Werten 30-35 einer microRNA in beiden Vergleichsgruppen werden die erhaltenen Daten zwar vom Hersteller als auswertbar angegeben, allerdings nur unter der Prämisse einer ausreichenden Anzahl von Replikaten. Da der hier durchgeführte Array lediglich eine Einzelmessung darstellt, wurden die entsprechenden Daten für eine weitere Analyse nicht verwendet.
- 3) Ct-Werte ≥ 35 einer microRNA in einer der beiden Vergleichsgruppen sind aufgrund eines vom Hersteller definierten Cut-Offs nicht mehr auswertbar. Diese Werte wurden ebenfalls verworfen.

Nach Ausschluss aufgrund der oben genannten Kriterien verblieben von den insgesamt 84 erfassten microRNA 68, welche in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt sind.

Die Analyse der PCR-Array-Daten zeigt, dass die Mehrheit der erfassten microRNA in ihrer Expression verstärkt vorliegen (N = 58). Demgegenüber steht eine geringere Anzahl von microRNA (N = 10), welche vermindert exprimiert werden. Betrachtet man den Faktor der jeweiligen Regulation, ist auffällig, dass dieser selbst bei der am stärksten hochregulierten microRNA (miR-34c-5p) lediglich 5,66 beträgt.

Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigten sich 11 unterschiedliche microRNA in den HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen mehr als doppelt so stark exprimiert (miR-34c-5p, miR-182-5p, miR-214-3p, miR-141-3p, miR-411-5p, miR-27a-3p, miR-125b-5p, miR-199a-5p, miR-21a-5p, miR-96-5p, miR-15b-5p sowie miR-16-5p). Auf der anderen Seite gibt es mit miR-22-3p nur eine microRNA, welche mindestens um den Faktor zwei vermindert vorliegt (-2,01-fache Regulation).

Unter Berücksichtigung der bisher beschriebenen microRNA, welchen im Rahmen einer cholestatischen Erkrankung respektive einer HBV-Infektion eine mögliche Rolle zugesprochen wurde, fällt auf, dass sich ein Großteil dieser auch in dem PCR-Array wiederfindet und in ihrer Expression verändert vorliegt.

Bereits beschrieben wurden demnach Vertreter der let7-Familie (let7a, let7b, let7d, let7d, let7f, let7g sowie let7i), miR-17, miR-19, miR-21, miR-24, miR-27, miR-29, miR-34, miR-92, miR-99a, miR-125, miR-139, miR-144, miR-199, miR-210 und miR-214.

Bezeichnung	x-fache Regulation	Bezeichnung	x-fache Regulation
<i>mmu-miR-34c-5p</i>	5,6586	<i>mmu-miR-126-3p</i>	1,3673
<i>mmu-miR-182-5p</i>	4,6841	<i>mmu-let-7a-5p</i>	1,3606
<i>mmu-miR-214-3p</i>	3,6174	<i>mmu-miR-23b-3p</i>	1,3569
<i>mmu-miR-141-3p</i>	3,4814	<i>mmu-miR-140-3p</i>	1,3568
<i>mmu-miR-411-5p</i>	3,2611	<i>mmu-miR-23a-3p</i>	1,3434
<i>mmu-miR-27a-3p</i>	3,1645	<i>mmu-miR-29b-3p</i>	1,2990
<i>mmu-miR-125b-5p</i>	2,7687	<i>mmu-miR-93-5p</i>	1,2964
<i>mmu-miR-199a-5p</i>	2,6192	<i>mmu-miR-30e-5p</i>	1,2940
<i>mmu-miR-21a-5p</i>	2,6140	<i>mmu-miR-30d-5p</i>	1,2905
<i>mmu-miR-96-5p</i>	2,4748	<i>mmu-miR-106b-5p</i>	1,2872
<i>mmu-miR-15b-5p</i>	2,3438	<i>mmu-miR-28c</i>	1,2817
<i>mmu-miR-16-5p</i>	2,0629	<i>mmu-miR-29a-3p</i>	1,2730
<i>mmu-miR-142-3p</i>	1,9780	<i>mmu-miR-186-5p</i>	1,2701
<i>mmu-miR-872-5p</i>	1,7916	<i>mmu-miR-10a-5p</i>	1,2380
<i>mmu-miR-425-5p</i>	1,6856	<i>mmu-let-7d-5p</i>	1,2349
<i>mmu-miR-31-5p</i>	1,6824	<i>mmu-miR-17-5p</i>	1,2099
<i>mmu-miR-744-5p</i>	1,6593	<i>mmu-miR-541-5p</i>	1,1997
<i>mmu-miR-191-5p</i>	1,6501	<i>mmu-let-7g-5p</i>	1,1529
<i>mmu-miR-503-5p</i>	1,6485	<i>mmu-miR-27b-3p</i>	1,1474
<i>mmu-miR-140-5p</i>	1,6310	<i>mmu-let-7c-5p</i>	1,1418
<i>mmu-miR-24-3p</i>	1,6276	<i>mmu-miR-19b-3p</i>	1,1391
<i>mmu-let-7i-5p</i>	1,5702	<i>mmu-miR-20a-5p</i>	1,0993
<i>mmu-miR-125a-5p</i>	1,5328	<i>mmu-miR-19a-3p</i>	1,0761
<i>mmu-miR-155-5p</i>	1,4680	<i>mmu-miR-92a-3p</i>	1,0553
<i>mmu-let-7e-5p</i>	1,4679	<i>mmu-miR-30a-5p</i>	1,0505
<i>mmu-miR-10b-5p</i>	1,4619	<i>mmu-let-7f-5p</i>	1,0467
<i>mmu-miR-322-5p</i>	1,4589	<i>mmu-miR-32-5p</i>	1,0185
<i>mmu-miR-15a-5p</i>	1,4398	<i>mmu-let-7b-5p</i>	1,0150
<i>mmu-miR-18a-5p</i>	1,4333	<i>mmu-miR-30c-5p</i>	1,0073

Tabelle 1: Tabellarische Auflistung der im PCR-Array verstärkt exprimierten microRNA.

Messung mit Qiagen miFinder Mouse PCR-Array. Insgesamt wurden 86 verschiedene microRNA detektiert, nach Ausschluss aufgrund Ct-Wert-bezogener Kriterien verblieben davon 68. Eine Hochregulation wiesen wiederum 58 microRNA auf.

Analyse von gepoolten Leberproben (N = 5) von HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu BALB/c-Wildtypen im Alter von jeweils 16 Wochen.

Bezeichnung	x-fache Regulation
<i>mmu-miR-150-5p</i>	-1,0216
<i>mmu-miR-99a-5p</i>	-1,0394
<i>mmu-miR-126-5p</i>	-1,0588
<i>mmu-miR-25-3p</i>	-1,0659
<i>mmu-miR-130a-3p</i>	-1,0841
<i>mmu-miR-101a-3p</i>	-1,3744
<i>mmu-miR-335-5p</i>	-1,4949
<i>mmu-miR-144-3p</i>	-1,6883
<i>mmu-miR-142-5p</i>	-1,7046
<i>mmu-miR-22-3p</i>	-2,0092

Tabelle 2: Tabellarische Auflistung der im PCR-Array vermindert exprimierten microRNA Messung mit Qiagen miFinder Mouse PCR-Array. Insgesamt wurden 86 microRNA detektiert, nach Ausschluss aufgrund Ct-Wert-bezogener Kriterien verblieben davon 68. Eine verminderte Expression wiesen 10 microRNA auf. Analyse von gepoolten Leberproben (N = 5) von HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu BALB/c-Wildtypen im Alter von jeweils 16 Wochen.

3.1.2 Ergebnisse des micro-Array

Neben dem PCR-Array bietet eine micro-Array-Analyse die Möglichkeit, ausgehend von einer relativ geringen Menge Probenmaterial, mehrere Hundert Zielsequenzen zu analysieren. Der hier verwendete micro-Array wird in Kapitel 5.3.7 beschrieben. Die Datenanalyse und weitergehende Experimente fokussierten sich in diesem Fall auf die am stärksten regulierten microRNA, unabhängig davon, ob diese in ihrer Expression vermindert oder verstärkt vorlagen. Zudem wurden darüber hinaus bestimmte microRNA, welche in Zusammenhang mit cholestatischen Erkrankungen beschrieben wurden, genauer analysiert. Als Probenmaterial für den Array wurden wie im zuvor durchgeführten PCR-Array eine gepoolte Probe (N = 5) von weiblichen Hybridmäusen (HBVTg-ABCB4^{-/-}) verwendet und mit der ebenfalls gepoolten Probe (N = 5) korrespondierender Wildtypen (BALB/c-Wt) im Alter von jeweils 16 Wochen verglichen. Im Rahmen der Array-Analyse wurden insgesamt 1900 microRNA erfasst. Eine Auflistung aller erfassten Sequenzen ist online abrufbar (siehe 5.3.7). Eine schematische Aufschlüsselung der micro-Array-Ergebnisse ist in Abbildung 9 dargestellt.

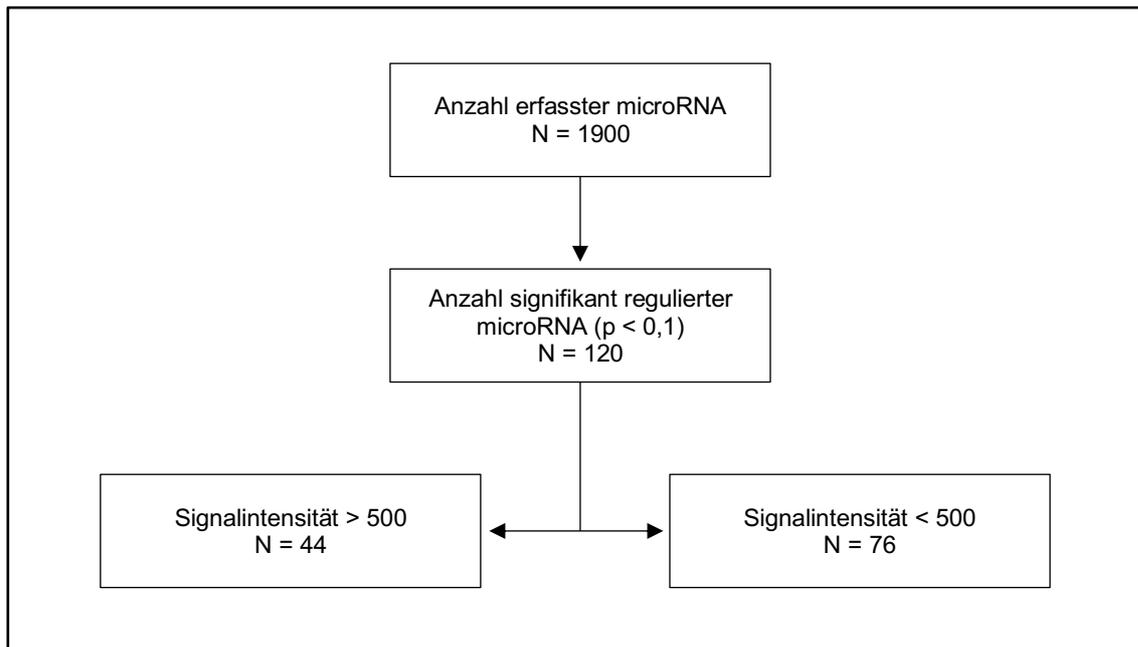


Abbildung 9: Schematische Darstellung der micro-Array-Ergebnisse. Insgesamt wurden 1900 microRNA erfasst. Von diesen zeigten 120 microRNA eine signifikante Expressionsänderung (Signifikanzniveau: $p < 0,1$). Unterteilt man diese nach der gemessenen Signalstärke, ergibt sich eine Gruppe von 44 microRNA mit einer Intensität > 500 sowie eine zweite Gruppe mit 76 microRNA, welche eine Intensität < 500 aufweisen.

Die nachfolgende Darstellung der micro-Array-Daten beschränkt sich auf die signifikant in ihrer Expression veränderten microRNA. Da die Signalintensität proportional zur Menge der hybridisierten microRNA ist, wurde der Fokus in den weiteren Analysen auf die microRNA mit einer Signalintensität von > 500 gerichtet.

Neben den microRNA mit einer signifikanten Expressionsänderung sowie einer Signalintensität > 500 werden darüber hinaus microRNA aufgelistet, deren Expressionsänderung zwar statistisch signifikant war, allerdings bei einer Signalintensität < 500 eine lediglich schwache Expression aufwiesen.

3.1.2.1 Verstärkt exprimierte microRNA mit einer Signalintensität von mindestens 500

Die Analyse der micro-Array-Daten zeigt eine signifikante Hochregulierung und zugleich eine Intensität über 500 bei insgesamt 19 microRNA (siehe Tabelle 3). Am stärksten reguliert ist demzufolge miR-23a-5p (4,34-fach), gefolgt von miR-23b-5p (3,58-fach), miR-21a-5p (3,11-fach) sowie miR-199a-3p (2,85-fach). Auffällig ist zudem die verstärkte Expression der verschiedenen Isoformen von miR-466 (miR-466m, miR-466i, miR-466h, miR-466h sowie miR-466f).

Im Hinblick auf Signalintensität und davon abgeleitet das quantitative Vorliegen zeigt erwartungsgemäß die leberspezifische miR-122-5p die höchste Intensität aller erfassten microRNA.

Bezeichnung	p-Wert	Intensität Wildtyp	Intensität HBVTg-ABCB4 ^{-/-}	x-fache Regulation
<i>mmu-miR-23a-3p</i>	2,35E-02	670	2.906	4,34
<i>mmu-miR-23b-3p</i>	3,92E-02	753	2.694	3,58
<i>mmu-miR-21a-5p</i>	1,84E-02	2.563	7.976	3,11
<i>mmu-miR-199a-3p</i>	4,00E-02	307	875	2,85
<i>mmu-miR-7047-5p</i>	7,91E-02	925	2.177	2,35
<i>mmu-let-7i-5p</i>	6,60E-02	737	1.456	1,98
<i>mmu-miR-149-3p</i>	6,35E-02	522	991	1,90
<i>mmu-miR-669e-3p</i>	6,80E-02	449	849	1,89
<i>mmu-let-7g-5p</i>	9,09E-02	1.023	1.797	1,76
<i>mmu-miR-574-5p</i>	6,19E-02	874	1.474	1,69
<i>mmu-miR-466m-3p</i>	8,90E-02	354	591	1,67
<i>mmu-miR-669c-3p</i>	9,79E-02	816	1.305	1,60
<i>mmu-miR-122-5p</i>	2,44E-02	10.273	15.854	1,54
<i>mmu-miR-466i-5p</i>	7,95E-02	1.658	2.543	1,53
<i>mmu-miR-466i-3p</i>	6,94E-02	815	1.176	1,44
<i>mmu-miR-466h-3p</i>	5,87E-02	985	1.392	1,41
<i>mmu-miR-3082-5p</i>	6,40E-02	470	644	1,37
<i>mmu-miR-466f-3p</i>	7,62E-02	1.059	1.352	1,28
<i>mmu-miR-466g</i>	2,87E-02	548	665	1,21

Tabelle 3: Im micro-Array signifikant hochregulierte microRNA mit einer Signalstärke > 500. Insgesamt 19 microRNA sind signifikant hochreguliert. Am stärksten in ihrer Expression verstärkt sind demnach miR-23a-3p, miR-23b-5p sowie miR-21a-5p. Die höchste Signalintensität zeigt erwartungsgemäß die leberspezifische und quantitativ häufigste miR-122. Vergleich von HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen und BALB/c-Wildtypen im Alter von jeweils 16 Wochen.

3.1.2.2 Vermindert exprimierte microRNA mit einer Signalintensität von mindestens 500

Bei 25 microRNA ergibt die micro-Array-Analyse eine signifikant verminderte Regulation und eine Intensität über 500 in einer der beiden erfassten Proben (siehe Tabelle 4). Am stärksten beeinflusst wurden demnach miR-378b (-7,36-fach), miR-130a-5p (-5,34-fach) sowie miR-101a-3p und miR-101b-3p (-4,53-fach beziehungsweise -4,22-fach).

Bezeichnung	p-Wert	Intensität Wildtyp	Intensität HBVTg-ABCB4 ^{-/-}	x-fache Regulation
<i>mmu-miR-378b</i>	4,56E-02	638	87	-7,36
<i>mmu-miR-130a-3p</i>	2,28E-02	1.006	188	-5,34
<i>mmu-miR-101a-3p</i>	4,11E-02	804	177	-4,53
<i>mmu-miR-101b-3p</i>	4,28E-02	763	181	-4,22
<i>mmu-miR-30e-5p</i>	1,81E-02	2.006	598	-3,36
<i>mmu-miR-5100</i>	8,13E-02	880	286	-3,07
<i>mmu-miR-2137</i>	7,89E-02	3.355	1.232	-2,72
<i>mmu-miR-19b-3p</i>	1,95E-02	831	311	-2,67
<i>mmu-miR-5121</i>	6,95E-02	1.108	417	-2,66
<i>mmu-miR-30a-5p</i>	3,80E-02	4.029	1.680	-2,40
<i>mmu-miR-17-5p</i>	2,60E-02	566	239	-2,37
<i>mmu-miR-378a-3p</i>	3,70E-02	712	302	-2,36
<i>mmu-miR-378c</i>	6,64E-02	562	242	-2,32
<i>mmu-miR-29c-3p</i>	3,14E-02	1.721	756	-2,28
<i>mmu-miR-3960</i>	6,10E-02	1.151	507	-2,27
<i>mmu-miR-20a-5p</i>	4,38E-02	988	476	-2,07
<i>mmu-miR-6538</i>	3,60E-02	1.830	947	-1,93
<i>mmu-miR-145b</i>	7,36E-02	578	325	-1,77
<i>mmu-miR-30b-5p</i>	8,98E-02	2.902	1.810	-1,60
<i>mmu-miR-5126</i>	3,40E-02	2.576	1.618	-1,59
<i>mmu-miR-194-5p</i>	2,87E-02	7.341	4.619	-1,59
<i>mmu-miR-3535</i>	4,98E-02	710	453	-1,57
<i>mmu-miR-143-3p</i>	6,63E-02	1.207	835	-1,45
<i>mmu-miR-30d-5p</i>	9,26E-02	1.791	1.304	-1,37
<i>mmu-miR-29a-3p</i>	6,05E-02	6.806	4.983	-1,37

Tabelle 4: Im micro-Array signifikant vermindert regulierte microRNA mit einer Signalstärke über 500. Insgesamt zeigten 25 microRNA in der micro-Array-Analyse eine signifikant verminderte Regulation und zugleich eine Intensität höher als 500. Vergleich von HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen zu BALB/c-Wildtypen im Alter von jeweils 16 Wochen.

3.1.2.3 Verstärkt oder vermindert exprimierte microRNA mit einer Signalintensität von unter 500

Insgesamt wurden im micro-Array 32 microRNA mit verstärkter Expression sowie 44 microRNA mit verminderter Expression erfasst, die im Vergleich von den 16 Wochen alten HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen mit den korrespondierenden BALB/c-Wildtypen signifikant reguliert vorlagen, jedoch in beiden Gruppen eine maximale Intensität von 500 aufwiesen.

Bezeichnung	p-Wert	Intensität Wildtyp	Intensität HBVTg-ABCB4 ^{-/-}	x-fache Regulation
<i>mmu-miR-466f</i>	7,51E-03	31	156	5,04
<i>mmu-miR-200c-3p</i>	9,97E-02	14	61	4,42
<i>mmu-miR-223-3p</i>	5,19E-02	49	215	4,40
<i>mmu-miR-146b-5p</i>	8,47E-02	13	58	4,37
<i>mmu-miR-6968-3p</i>	5,50E-02	11	44	4,12
<i>mmu-miR-8110</i>	5,49E-02	36	140	3,94
<i>mmu-miR-7085-3p</i>	9,68E-02	11	40	3,46
<i>mmu-let-7e-5p</i>	7,76E-02	58	194	3,36
<i>mmu-miR-1934-3p</i>	2,77E-02	54	176	3,23
<i>mmu-miR-7081-5p</i>	4,85E-02	69	218	3,16
<i>mmu-miR-7036a-5p</i>	7,58E-02	15	48	3,16
<i>mmu-miR-200b-3p</i>	4,56E-02	88	266	3,01
<i>mmu-miR-34a-5p</i>	6,62E-03	70	194	2,79
<i>mmu-miR-429-3p</i>	9,18E-02	33	88	2,69
<i>mmu-miR-15b-5p</i>	3,53E-02	174	456	2,63
<i>mmu-miR-7045-3p</i>	6,38E-02	22	58	2,60
<i>mmu-miR-365-3p</i>	8,46E-02	23	51	2,25
<i>mmu-let-7k</i>	2,93E-02	101	222	2,20
<i>mmu-miR-466f-5p</i>	8,82E-03	78	150	1,92
<i>mmu-miR-6944-5p</i>	7,07E-02	109	199	1,83
<i>mmu-miR-494-3p</i>	3,58E-02	160	287	1,79
<i>mmu-miR-3547-5p</i>	9,35E-02	48	82	1,71
<i>mmu-miR-7044-5p</i>	2,52E-02	54	88	1,62
<i>mmu-miR-1839-3p</i>	3,03E-02	112	178	1,59
<i>mmu-miR-125a-3p</i>	6,59E-02	28	44	1,58
<i>mmu-miR-6908-5p</i>	6,40E-02	39	60	1,54
<i>mmu-miR-6981-5p</i>	3,15E-02	292	450	1,54
<i>mmu-miR-7212-3p</i>	8,01E-02	44	66	1,49
<i>mmu-miR-200a-3p</i>	1,79E-02	143	207	1,45
<i>mmu-miR-466c-5p</i>	7,61E-02	237	318	1,34
<i>mmu-miR-139-5p</i>	6,42E-02	73	90	1,24
<i>mmu-miR-3095-3p</i>	4,36E-02	322	391	1,21

Tabelle 5: Im micro-Array signifikant verstärkt regulierte microRNA mit einer Intensität von maximal 500.

Insgesamt zeigten 32 verschiedene microRNA in der micro-Array-Analyse eine signifikant verstärkte Regulation und zugleich eine Intensität geringer als 500.

Vergleich von HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen zu BALB/c-Wildtypen im Alter von jeweils 16 Wochen.

Bezeichnung	p-Wert	Intensität Wildtyp	Intensität HBVTg-ABCB4 ^{-/-}	x-fache Regulation
<i>mmu-miR-677-5p</i>	1,92E-02	28	0	-2206,50
<i>mmu-miR-196a-1-3p</i>	5,12E-02	25	0	-1999,79
<i>mmu-miR-677-3p</i>	3,92E-02	288	34	-8,50
<i>mmu-miR-3099-5p</i>	4,93E-02	68	9	-7,55
<i>mmu-miR-210-3p</i>	9,82E-02	44	7	-6,03
<i>mmu-miR-6395</i>	4,78E-02	37	7	-5,60
<i>mmu-miR-192-3p</i>	2,28E-02	240	45	-5,32
<i>mmu-miR-186-5p</i>	5,55E-02	153	29	-5,21
<i>mmu-miR-212-3p</i>	8,14E-02	60	12	-5,05
<i>mmu-miR-802-5p</i>	8,41E-02	142	32	-4,41
<i>mmu-miR-700-3p</i>	7,79E-02	70	18	-3,92
<i>mmu-miR-5107-5p</i>	2,66E-02	89	25	-3,60
<i>mmu-miR-7661-3p</i>	4,65E-02	32	9	-3,55
<i>mmu-miR-199b-5p</i>	7,94E-02	73	25	-2,95
<i>mmu-miR-7235-3p</i>	5,32E-02	201	69	-2,91
<i>mmu-miR-7058-3p</i>	9,09E-02	336	116	-2,89
<i>mmu-miR-6946-3p</i>	3,76E-02	89	32	-2,82
<i>mmu-miR-346-3p</i>	3,20E-02	294	109	-2,71
<i>mmu-miR-485-3p</i>	6,81E-02	167	64	-2,61
<i>mmu-miR-6975-3p</i>	5,01E-02	82	32	-2,56
<i>mmu-miR-101c</i>	3,14E-02	68	27	-2,49
<i>mmu-miR-7050-5p</i>	5,90E-02	38	15	-2,43
<i>mmu-miR-19a-3p</i>	5,23E-02	36	15	-2,36
<i>mmu-miR-7027-3p</i>	2,02E-02	122	54	-2,25
<i>mmu-miR-1843b-5p</i>	6,90E-02	93	43	-2,15
<i>mmu-miR-7010-3p</i>	8,55E-02	76	37	-2,07
<i>mmu-miR-1903</i>	7,55E-02	158	78	-2,02
<i>mmu-miR-30c-2-3p</i>	6,08E-02	45	23	-2,00
<i>mmu-miR-497a-5p</i>	4,07E-02	135	71	-1,90
<i>mmu-miR-6385</i>	4,71E-02	91	49	-1,86
<i>mmu-miR-6896-3p</i>	5,43E-02	310	167	-1,86
<i>mmu-miR-6366</i>	7,15E-02	112	60	-1,85
<i>mmu-miR-29b-3p</i>	5,46E-02	242	130	-1,85
<i>mmu-miR-1231-5p</i>	5,49E-02	50	27	-1,84
<i>mmu-miR-758-5p</i>	7,91E-02	44	24	-1,84
<i>mmu-miR-140-3p</i>	7,25E-02	157	85	-1,83
<i>mmu-miR-125a-5p</i>	5,38E-02	197	110	-1,79
<i>mmu-miR-20b-5p</i>	2,14E-02	78	44	-1,78
<i>mmu-miR-193a-3p</i>	3,63E-02	174	99	-1,75
<i>mmu-miR-199a-5p</i>	6,43E-02	409	239	-1,71
<i>mmu-miR-3620-5p</i>	6,47E-02	458	276	-1,66
<i>mmu-miR-1966-5p</i>	4,83E-02	99	71	-1,41
<i>mmu-miR-652-3p</i>	8,67E-02	111	82	-1,36
<i>mmu-miR-706</i>	5,37E-02	43	37	-1,16

Tabelle 6: Im micro-Array signifikant vermindert regulierte microRNA mit maximaler Intensität 500. Insgesamt zeigten 44 verschiedene microRNA in der micro-Array-Analyse eine signifikant schwächere Regulation und zugleich eine Intensität geringer als 500. Vergleich von HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen zu BALB/c-Wildtypen im Alter von jeweils 16 Wochen.

Die schwache Intensität spricht für ein quantitativ geringes Vorliegen der aufgeführten microRNA, aus diesem Grund waren diese für eine weitergehende Analyse mittels qRT-PCR nicht geeignet. Nichtsdestotrotz lässt sich alleine aufgrund der gemessenen Intensität nicht abschätzen, inwiefern diese schwach exprimierten microRNA Einfluss auf die Genexpression haben. In Abhängigkeit der jeweiligen Ziel-mRNA und der damit verbundenen Regulation der Translation bestimmter Proteine ist auch eine mögliche Einflussnahme von gering exprimierten microRNA nicht auszuschließen.

3.2 Weiterführende Expressionsanalysen einzelner microRNA mittels qRT-PCR

3.2.1 MiR-199a-3p in HBVTg-, ABCB4^{-/-}- und HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen

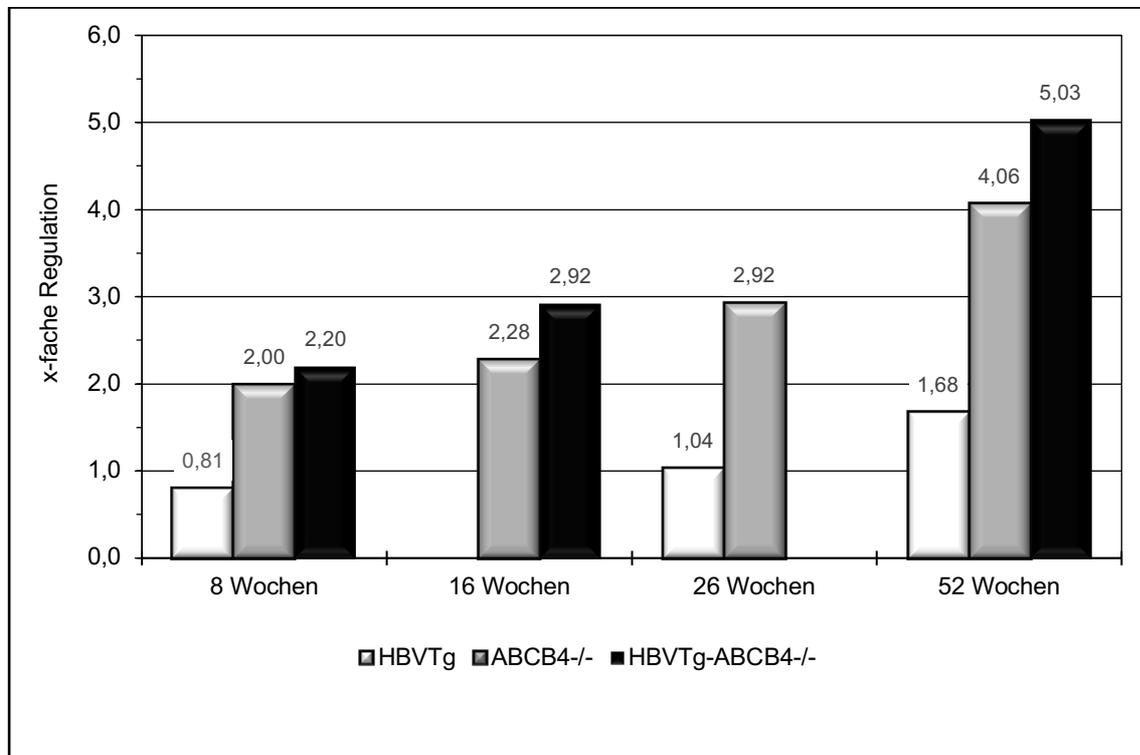


Schaubild 1: Expressionsanalyse von miR-199a-3p im Langzeitmodell mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Expression von miR-199a-3p in den Mausmodellen HBVTg (weiße Balken), ABCB4^{-/-} (graue Balken) sowie im Hybridmodell HBVTg-ABCB4^{-/-} (schwarze Balken) im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Die Messung erfolgte in gepoolten Proben (N = 4 - 5) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (BALB/c).

Im micro-Array der 16 Wochen alten Mäuse zeigt miR-199a-3p mit einer 2,92-fachen Hochregulation im Vergleich des HBVTg-ABCB4^{-/-}-Modells mit den Wildtypen die stärkste Expressionsänderung. Auch im PCR-Array konnte eine 2,6-fach verstärkte Expression gezeigt werden.

Diese microRNA wurde in früheren Studien bereits im Zusammenhang mit cholestatischen Erkrankungen beschrieben (siehe Kapitel 1.2.3) und war aus diesen Gründen für die nähere Analyse in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Mausmodellen von Interesse. Die verstärkte Expression von miR-199a-3p im micro-Array konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden.

Im zeitlichen Verlauf zeigt die Expression von miR-199a-3p im ABCB4^{-/-}-Modell eine im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Expression. Bereits im Alter von 8 Wochen beträgt der

Faktor 2,00. Mit Zunahme des Alters auf 16, 26 und 52 Wochen nimmt die relative Expression um den Faktor 2,28-fach, 2,92-fach und 4,06-fach zu.

Ein anderes Bild mit unterschiedlicher Expression zeigt sich im HBVTg-Modell. Im Alter von 8 Wochen zeigt sich hier sogar eine im Vergleich zum Wildtyp verminderte Expression um den Faktor 0,81. Zum Zeitpunkt 26 Wochen liegen die Expressionslevel dieser microRNA in beiden Modellen auf einem vergleichbaren Niveau (Faktor 1,04). Nach 52 Wochen zeigt sich schließlich eine im HBVTg-Modell um den Faktor 1,68 verstärkte Expression von miR-199a-3p im Vergleich zum Wildtyp (Schaubild 1).

Im Hybridmodell ergibt sich im Alter von 8, 16 und 52 Wochen ein dem Expressionslevel im ABCB4^{-/-}-Modell vergleichbarer Verlauf. Zum Zeitpunkt 8 Wochen lässt sich eine 2,2-fache Hochregulation von miR-199a-3p ausmachen, die Expression nimmt daraufhin im zeitlichen Verlauf nach 16 Wochen (2,9-fach) beziehungsweise nach 52 Wochen (5,03-fach) zu.

3.2.2 MiR-182a-5p in HBVTg-, ABCB4^{-/-}- und HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen

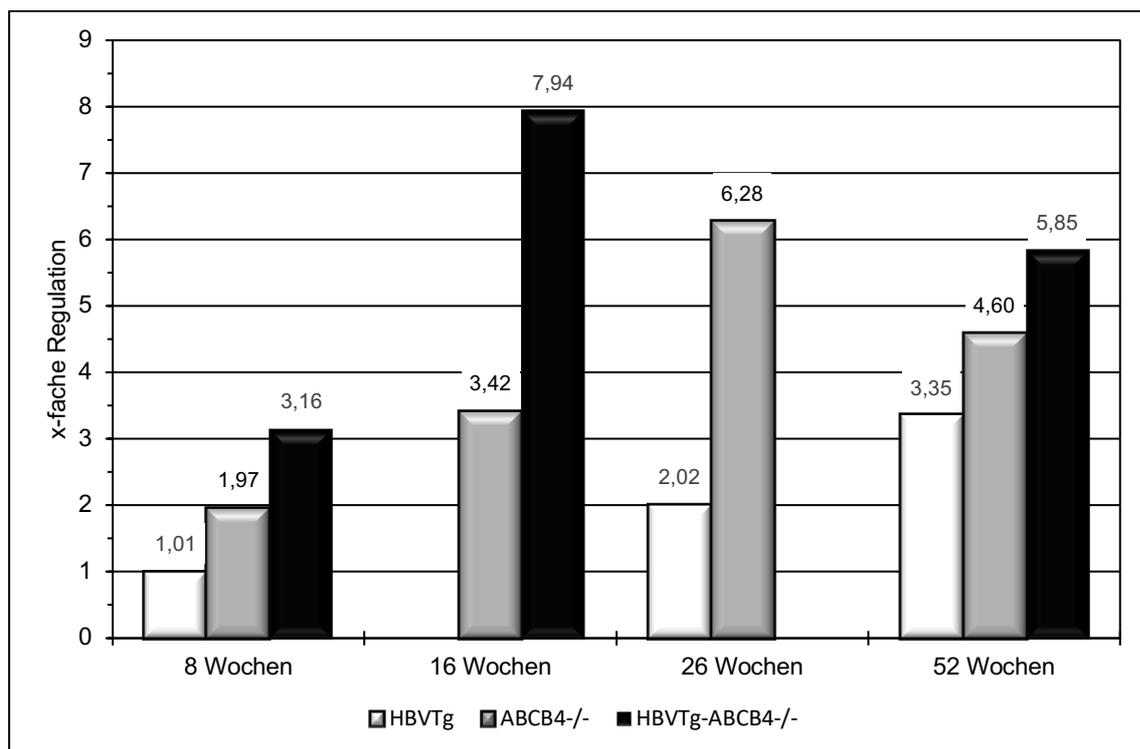


Schaubild 2: Expressionsanalyse von miR-182a-5p im Langzeitmodell mittels qRT-PCR.

Dargestellt ist die relative Expression von miR-182a-5p in den Mausmodellen HBVTg (weiße Balken), ABCB4^{-/-} (graue Balken) sowie HBVTg-ABCB4^{-/-} (schwarze Balken) im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Die Messung erfolgte in gepoolten Proben (N = 4 - 5) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (BALB/c).

Nach miR-34c war miR-182a-5p im PCR-Array mit einer mehr als 4,6-fach verstärkten Expression die am zweitstärksten regulierte und erfasste microRNA. Die Validierung dieser Regulation mittels qRT-PCR ergab einen noch stärkeren Expressionsunterschied (siehe Schaubild 2). Im Alter von 16 Wochen ist die Expression von miR-182a-5p im Hybridmodell im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen hier um den Faktor 7,94 erhöht. Die weitere Analyse dieser microRNA in dem HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mausmodell ergab, dass bereits nach 8 Wochen eine verstärkte Expression vorliegt (3,16-fach). Im Alter von 52 Wochen hingegen hat die Expression von miR-182a-5p im Vergleich zu den 16 Wochen alten Mäusen leicht abgenommen, ist aber noch immer mehr als 5,85-fach so stark wie in der Kontrollprobe (Schaubild 2). Betrachtet man ABCB4-defiziente Mäuse isoliert, lässt sich ein ähnlicher Verlauf ausmachen. Auch in diesem Mausmodell ist bereits nach 8 Wochen eine knapp doppelt so starke Expression von miR-182a-5p (1,97-fach) messbar, nach 26 Wochen zeigt sich, analog zu dem Hybridmodell, die maximale relative Expression (6,28-fach), um dann im Alter von 52 Wochen auf eine 4,60-fache Regulation zu sinken.

Im HBVTg-Modell hingegen ergibt die Expressionsanalyse von miR182a-5p eine im Vergleich mit den bisher beschriebenen Modellen andere Tendenz. Die Expressionsänderung von miR-182a-5p entspricht hier einem nahezu linearen, stetig steigenden Verlauf mit dem Lebensalter der Tiere.

Im Alter von 8 Wochen zeigt sich keine Änderung der Expression im Vergleich zum Wildtyp, während im Alter von 26 Wochen eine nahezu verdoppelte Expression und im Alter von 52 Wochen eine im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor drei verstärkte Expression von miR-182a-5p vorliegt.

3.2.3 MiR-21a-5p in HBVTg-, ABCB4^{-/-}- und HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen

Frühere Studien zeigten, dass miR-21 im Rahmen fibrotischer Erkrankungen verschiedener Organe verstärkt exprimiert wurde und die Stimulierung und Aktivierung von Fibroblasten über mehrere Signalwege induziert [210–215]. Aus diesem Grund war diese microRNA auch für unsere Analysen von besonderem Interesse.

Der PCR-Array ergab in den 16 Wochen alten HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen eine um den Faktor 3,11 verstärkte Expression. Der durchgeführte micro-Array zeigte mit einer 2,6-fachen Hochregulation im Vergleich zum Wildtyp ein vergleichbares Ergebnis. Die Validierung dieser Messung mittels PCR ergab eine 2,31-fache Hochregulation dieser microRNA (Schaubild 3).

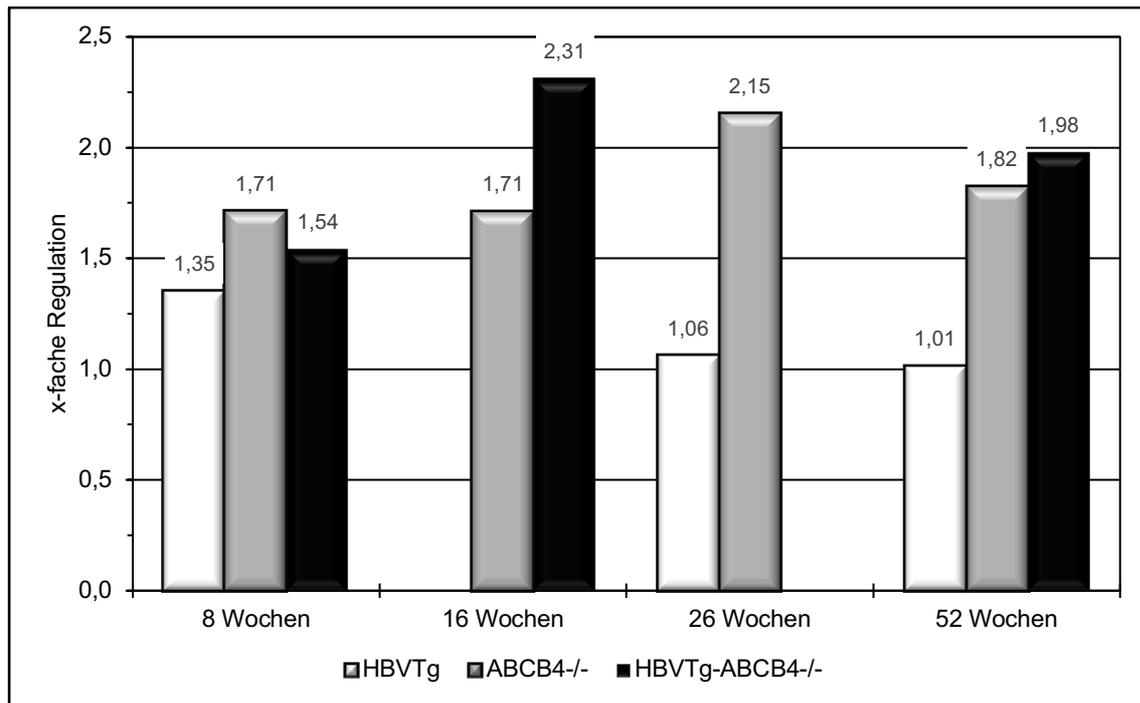


Schaubild 3: Expressionsanalyse von miR-21a-5p im Langzeitmodell mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Expression von miR-21a-5p in den Mausmodellen HBVTg (weiße Balken), ABCB4^{-/-} (graue Balken) sowie HBVTg-ABCB4^{-/-} (schwarze Balken) im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Die Messung erfolgte in gepoolten Proben (N = 4 - 5) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (BALB/c).

Im Alter von 8 Wochen ist die Expression von miR-21a-5p bereits 1,5-fach verstärkt, erreicht im Alter von 16 Wochen mit einer 2,31-fachen Hochregulation ihren Höhepunkt, um dann nach 52 Wochen eine nahezu doppelt so starke Expression wie der Wildtyp zu zeigen (1,98-fach) (Schaubild 3).

Einen ähnlichen Verlauf lässt sich in der Analyse der miR-21a-5p im ABCB4^{-/-}-Modell ausmachen. Auch hier zeigt sich eine Zunahme der Expression nach 8 Wochen um den Faktor 1,71. Im zeitlichen Verlauf bleibt diese Expressionsverstärkung auf einem vergleichbaren Niveau und beträgt im Alter von 52 Wochen 1,82 (Schaubild 3). Lediglich zum Zeitpunkt 26 Wochen lässt sich eine Zunahme der Expression um den Faktor 2,15 verzeichnen.

Ein gegensätzliches Bild zeichnet wiederum das HBV-transgene Mausmodell. Zeigt sich im Alter von 8 Wochen noch eine 1,35-fach verstärkte Expression von miR-21a-5p, sinkt diese über die Zeitpunkte von 26 (1,06-fach) sowie 52 Wochen (1,01-fach) auf das Expressionsniveau des Wildtyps (Schaubild 3).

3.2.4 MiR-122-5p in HBVTg-, ABCB4^{-/-}- und HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen

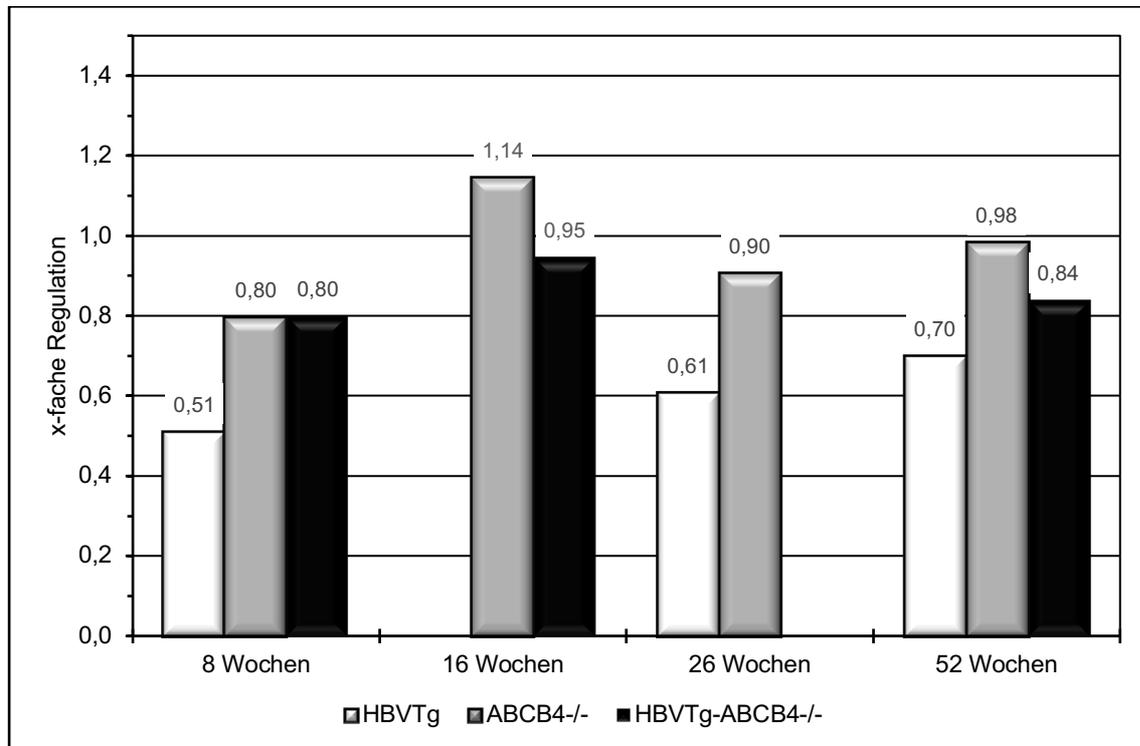


Schaubild 4: Expressionsanalyse von miR-122-5p im Langzeitmodell mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Expression von miR-122-5p in den Mausmodellen HBVTg (weiße Balken), ABCB4^{-/-} (graue Balken) sowie HBVTg-ABCB4^{-/-} (schwarze Balken) im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Die Messung erfolgte in gepoolten Proben (N=4-5) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (BALB/c).

Die genauere Betrachtung von miR-122a-5p war aus mehreren Gründen für eine weitergehende Analyse interessant. Zum einen ist diese microRNA, wie bereits erwähnt, leberspezifisch und zudem die quantitativ häufigste microRNA der Leber. Aufgrund ihrer regulatorischen Eigenschaften in einer Vielzahl von hepatischen Prozessen und Pathologien lag die Vermutung nahe, dass miR-122a-5p auch in den von uns analysierten Mausmodellen einer Regulation unterliegt.

In der durchgeführten micro-Array-Analyse zeigte sich zunächst eine geringfügig verstärkte Expression mit dem Faktor 1,38. In der anschließenden qRT-PCR ließ sich dieses Ergebnis nicht validieren. Im Gegensatz zu den vorher erhobenen Daten ergab die Messung in den 16 Wochen alten HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen sogar eine minimal verminderte Expression (0,95-fach). Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch im Alter von 8 (0,80-fach) und 52 Wochen (0,84-fach) (Schaubild 4).

Betrachtet man die Expressionsänderung von miR-122a-5p in den verschiedenen Modellen zu den Zeitpunkten von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen, lässt sich grundsätzlich feststellen, dass miR-122a-5p lediglich schwach in ihrer Expression verändert wird. In den HBVTg-Mäusen zeigt sich nach 8 Wochen eine im Vergleich zum Wildtyp halbierte Expression (0,51-fach) von miR-122a-5p und verbleibt sowohl im Alter von 26 Wochen (0,61-fach) sowie 52 Wochen (0,70-fache Expression) auf einem ähnlichen Niveau (Schaubild 4).

Entgegen der Annahme, dass miR-122a-5p als leberspezifische microRNA im Rahmen einer signifikanten Leberschädigung, wie sie durch den Knockout des ABCB4-Gens bedingt auftritt, stark reguliert wird, zeigt die qRT-PCR eine über alle Zeitpunkte allenfalls minimale Expressionsminderung, welche mit den Kontrollen vergleichbar ist. So zeigt sich in den Mäusen mit ABCB4-Knockout im Alter von 8 Wochen eine um den Faktor 0,80 verminderte Expression von miR-122a-5p. Nach 16 Wochen zeigte sich eine Zunahme der Expression auf das 1,14-fache. Nach 26 Wochen hingegen nimmt die Expression wieder ab (0,90-fach), um letztendlich im Alter von 52 Wochen das nahezu gleiche Expressionsniveau der Wildtypen zu erreichen (0,98-fache Regulation) (Schaubild 4).

3.2.5 MiR-23a-3p in HBVTg-, ABCB4^{-/-}- und HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen

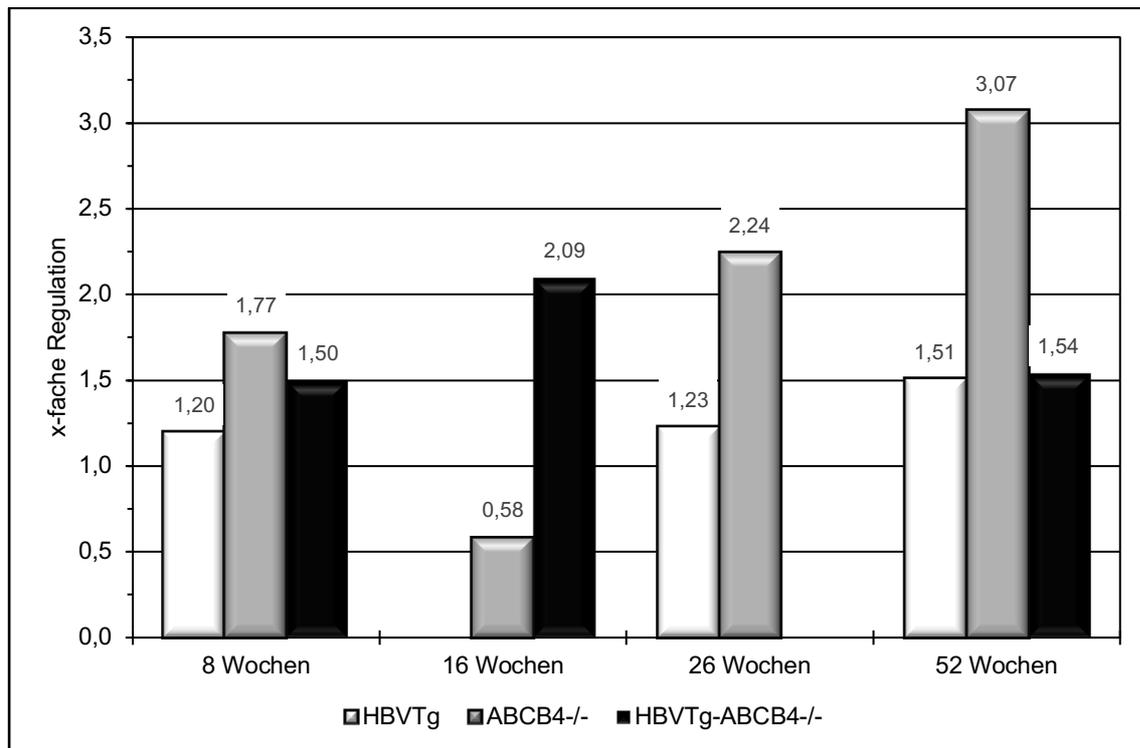


Schaubild 5: Expressionsanalyse von miR-23a-3p im Langzeitmodell mittels qRT-PCR. Dargestellt ist die relative Expression von miR-122-5p in den Mausmodellen HBVTg (weiße Balken), ABCB4^{-/-} (graue Balken) sowie HBVTg-ABCB4^{-/-} (schwarze Balken) im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Die Messung erfolgte in gepoolten Proben (N = 4 - 5) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (BALB/c).

In der micro-Array-Analyse verzeichneten die Isoformen von miR-23 (miR-23a-3p sowie miR-23b-3p) in der Gruppe der verstärkt exprimierten microRNA mit einer Intensität von über 500 und einer Regulation von 4,34-fach respektive 3,58-fach die stärkste Expressionsänderung (Schaubild 5). Die Validierung dieser Ergebnisse zeigt in der qRT-PCR im Alter von 16 Wochen eine verdoppelte (2,09-fache) Expression in den HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen und bestätigt somit die Array-Daten. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der miR-23a-3p-Expression in dem HBVTg-ABCB4^{-/-}-Modell, zeigt sich nach 8 Wochen eine 1,5-fache Hochregulation, welche bis auf die bereits erwähnte 2,09-fache Regulation im Alter von 16 Wochen ansteigt, um dann nach 52 Wochen wieder auf das Level von 8 Wochen zu sinken (1,54-fache Regulation).

In den ABCB4^{-/-}-Mäusen zeigt sich ein anderer Verlauf der Expression. Nach 8 Wochen ist miR-23a-3p ähnlich stark exprimiert wie in dem Hybridmodell (1,77-fache Regulation) (Schaubild 5). Nach 16 Wochen findet sich eine fast halbierte Expression (0,58-fache Regulation), welche daraufhin bis zum Alter von 26 Wochen zunächst auf einen Wert

von 2,24-facher Regulation steigt, um schließlich im Alter von 52 Wochen die maximale relative Expression von 3,07-fach zu erreichen (Schaubild 5).

Das HBV-transgene Modell hingegen zeigt eine nahezu gleichbleibende Expressionsverstärkung im zeitlichen Verlauf. Im Alter von 8 Wochen ist diese microRNA im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtypen um den Faktor 1,20 verstärkt exprimiert, welche zum Zeitpunkt 26 Wochen (1,23-fache Regulation) bzw. nach 52 Wochen (1,51-fache Regulation) ansteigt (Schaubild 5).

3.2.6 MiR-101a-3p in HBVTg-, ABCB4^{-/-}- und HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäusen im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen

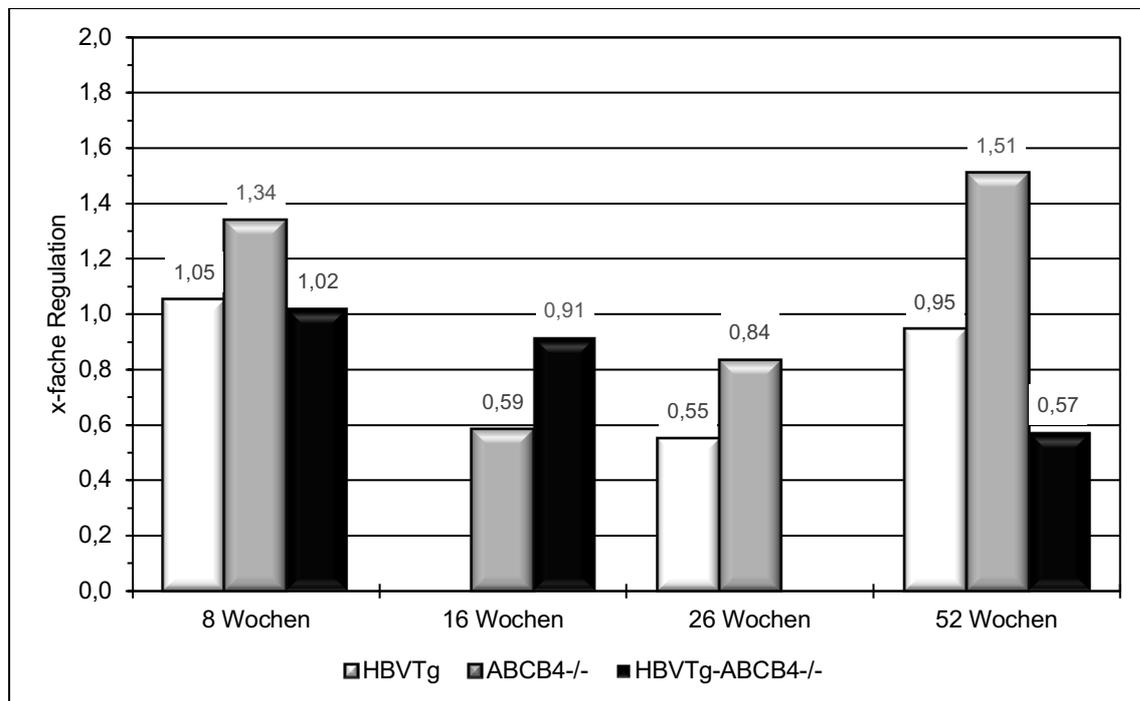


Schaubild 6: Expressionsanalyse von miR-101a-3p im Langzeitmodell mittels qRT-PCR.

Dargestellt ist die relative Expression von miR-122-5p in den Mausmodellen HBVTg (weiße Balken), ABCB4^{-/-} (graue Balken) sowie HBVTg-ABCB4^{-/-} (schwarze Balken) im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Die Messung erfolgte in gepoolten Proben (N = 4 - 5) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (BALB/c).

In der micro-Array-Analyse zeigte miR-101a-3p eine im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor -4,43 verminderte Regulation.

Die Validierung dieser Daten mittels qRT-PCR ergab lediglich eine geringe Expressionsänderung von miR-101a-3p um den Faktor 0,91. Im zeitlichen Verlauf zeigt diese microRNA in dem HBVTg-ABCB4^{-/-}-Modell im Alter von 8 Wochen eine dem Wildtyp vergleichbare Expression (1,02-fach), um an den Messzeitpunkten 16 Wochen (0,91-fache

Regulation) sowie 52 Wochen (0,57-fache Regulation) stetig abzunehmen. In den Mausmodellen mit jeweils einer solitären Genveränderung zeichnet sich hingegen ein anderes Bild. In den HBV-transgenen Mäusen ist das Expressionsniveau von miR-101a-3p nach 8 Wochen ebenfalls mit dem Wildtyp vergleichbar (1,05-fache Regulation), nach 26 Wochen halbiert sich die Expression (0,55-fach), steigt aber zum Zeitpunkt von 52 Wochen annähernd wieder bis auf das Niveau im Alter von 8 Wochen an (0,95-fache Regulation). Diesem Verlauf vergleichbar ist das Expressionsniveau von miR-101a-3p in der Probe der ABCB4^{-/-}-Mäuse. Initial zeigt sich in diesem Modell im Alter von 8 Wochen eine um den Faktor 1,34 verstärkte Expression, welche bis zum Alter von 16 Wochen abnimmt (0,59-fache Regulation). Analog zu dem HBV-transgenen Modell zeigt sich nach 26 Wochen eine gegenüber dem Wildtyp weiterhin verminderte Expression und im Alter von 52 Wochen (0,84-fache Regulation) eine verstärkte Expression (1,51-fach) (Schaubild 6).

4

4 Diskussion

4.1 Konzeptionelle Überlegungen

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Studien publiziert, welche sich dem Ziel widmen, die genaue biologische Funktion von microRNA zu beschreiben. Durch diese Daten, welche sowohl auf Computerberechnung als auch auf biochemischen sowie molekularbiologischen Analysen beruhen, konnte gezeigt werden, dass diese Gruppe von RNA-Molekülen in der Regulation der Genexpression eine zentrale Rolle einnimmt.

Aktuell sind Knock-Out-Modelle sowie Versuche mit ektopter Überexpression einzelner microRNA die Hauptquelle der verfügbaren Informationen. Die Forschung an microRNA-bezogenen Thematiken ist insgesamt sehr komplex, aufwendig und zeigt nur in begrenztem Maße eine Übertragbarkeit auf den Menschen. Die Beteiligung von microRNA in der Entstehung sowie Progression von Erkrankungen lässt sich allerdings nicht abstreiten. Bestimmte Tumorentitäten beispielsweise zeigen ein spezifisches Muster regulierter microRNA [216], was zur Annahme führte, dass es möglich sei, microRNA als diagnostisches Tool und als therapeutisches Mittel in den klinischen Alltag zu integrieren [217].

In diesem Zusammenhang bestand der primäre Fokus der Forschung zunächst in der Charakterisierung von microRNA-Expressionsprofilen unterschiedlicher Tumore, jedoch ist eine Beteiligung von microRNA in der Entstehung, Progression sowie Modulation von nahezu jeder Erkrankung wahrscheinlich. Um das Verständnis der Klasse der microRNA und damit einhergehend auch einer Vielzahl von Erkrankungen voranzutreiben, sind zunächst Expressionsanalysen notwendig. Diese dienen dem Zweck, die Anzahl unterschiedlicher microRNA einzugrenzen, um so eine spezifische Analyse einzelner microRNA zu ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die microRNA-Expressionsanalyse in drei unterschiedlichen Mausmodellen mit verschiedenen hepatischen Pathologien und beschreibt regulierte microRNA im Langzeitverlauf über 52 Wochen. Ein Großteil der durchgeführten experimentellen Arbeit besteht in der Durchführung von Array-Analysen eines Hybridmodells im Alter von 16 Wochen sowie der anschließenden Validierung und Verlaufsbeschreibung von ausgewählten microRNA in den verwendeten Mausmodellen mittels qRT-PCR.

Unser Ansatz erlaubt die Identifikation von microRNA sowie deren Beschreibung im Verlauf der jeweiligen Erkrankung und erlaubt Rückschlüsse auf die durch diese RNA-Moleküle beeinflussten Signalwege. Allerdings war eine weitergehende Analyse der Interaktion zwischen microRNA mit der jeweiligen Ziel-mRNA beziehungsweise der Auswirkungen von Expressionsänderungen einzelner microRNA auf Proteinebene aus Kapazitätsgründen nicht realisierbar und hätte den Umfang dieser Arbeit weit überschritten.

4.2 Ergebnisdiskussion

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit folgendes gezeigt werden:

1. Eine hepatische Schädigung, hervorgerufen durch einen Knock-Out des ABCB4-Gens respektive der Überexpression von Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus, zeigte in der micro-Array-Analyse sowohl signifikant verstärkte (N = 51) als auch verminderte (N = 69) microRNA-Expression.
2. MiR-199a-3p wird insbesondere in dem ABCB4^{-/-}-Modell verstärkt exprimiert und zeigt im Langzeitversuch eine stetig zunehmende relative Expression. Diese microRNA unterliegt im HBVTg-Modell hingegen lediglich einer schwach ausgeprägten Änderung, im zusätzlich analysierten Hybridmodell lässt sich ein verstärkender Effekt beider Pathologien auf das Expressionsniveau feststellen.
3. MiR-182a-5p zeigt in der Langzeitanalyse eine verstärkte Expression insbesondere in den ABCB4-defizienten Mäusen sowie in dem Hybridmodell.
4. Die leberspezifische und quantitativ häufigste miR-122-5p zeigt eine globale Expressionsminderung in allen drei Modellen, wobei dieser Effekt am stärksten in dem HBVTg-Modell zu beobachten ist.
5. MiR-21a-5p wird insbesondere in dem ABCB4^{-/-}-Modell sowie in dem Hybridmodell verstärkt reguliert. In dem HBVTg-Modell zeigte sich keine Änderung dieser microRNA.
6. Eine Änderung der Expression von miR-23a-3p zeigt sich vor allem im ABCB4^{-/-}-Modell und korreliert nach einer Expressionsminderung im Alter von 16 Wochen positiv mit dem Alter der Versuchstiere.
7. MiR-101a-3p weist im HBVTg-ABCB4^{-/-}-Modell eine stetig verminderte Expression auf. Demgegenüber steht eine verminderte Expression dieser microRNA in dem HBVTg- sowie in dem ABCB4^{-/-}-Modell im Alter von 16 und 26 Wochen, welche zum Zeitpunkt 52 Wochen im HBVTg-Modell das Niveau des Wildtyps erreicht beziehungsweise im ABCB4^{-/-}-Modell eine verstärkte Regulation aufweist.

4.2.1 MiR-199a-3p

Eine verstärkte Expression vom miR-199a-3p wurde bereits in früheren Studien im Zusammenhang mit Erkrankungen der Leber beschrieben [218]. Unsere Daten zeigten zunächst eine Hochregulation dieser microRNA um den Faktor 2,85 in der micro-Array-Analyse der 16 Wochen alten HBVTg-ABCB4^{-/-}-Mäuse. Die weiteren Messungen mittels qRT-PCR zeigten, dass diese verstärkte Expression offensichtlich hauptsächlich dem Knock-Out des ABCB4-Gens zuzuordnen ist. So weisen Mäuse mit solitärer ABCB4-Defizienz zum Zeitpunkt 16 Wochen eine 2,28-fache Regulation auf, demgegenüber steht eine 2,92-fache Regulation in den Hybridmodellen. Ein Vergleich der Expression von miR-199a-3p in den unterschiedlichen Modellen im Alter von 52 Wochen ergibt eine Hochregulation von 5,03-fach in dem Hybridmodell, welcher eine Expressionsänderung um den Faktor 4,06 in dem ABCB4^{-/-}-Modell respektive 1,68 in dem HBVTg-Modell gegenübersteht. Eine Erklärung für die Differenz der Expression in ABCB4-defizienten Mäusen sowie dem Hybridmodell besteht möglicherweise in synergistischen Effekten, welche durch beiden Pathologien bedingt werden. Eine Beteiligung von miR-199a-3p an der Regulation einer HBV-Infektion wurde bereits postuliert, da in der für HBs codierenden Region eine passende Zielsequenz identifiziert wurde. Auch zeigen weitergehende Experimente eine signifikante Reduktion der HBs-mRNA bei ektopter Überexpression von miR-199a-3p [219]. Inwiefern sich diese Mechanismen auf in-vivo-Modelle transferieren lassen, muss allerdings noch geklärt werden. Im Hinblick auf eine mögliche Rolle im Rahmen von fibrotischen Erkrankungen der Leber wurde miR-199a-3p in CCl₄-Mäusen bereits beschrieben [220, 221]. Unsere Daten, erhoben in dem ABCB4^{-/-}-Modell sowie in dem Hybridmodell, stützen diese Beobachtungen und zeigen insbesondere, dass die Expression dieser microRNA mit dem Alter der Tiere sowie der Progression der Fibrose korreliert [222] und aus diesem Grund in der Pathogenese der sklerosierenden Cholangitis beteiligt sein kann. Eine Erklärung für die im Alter zunehmende Expression von miR-199a-3p ist möglicherweise auch in der Beteiligung bei der Entstehung hepatischer Neoplasien zu suchen. Die chronische Inflammation führt in dem ABCB4^{-/-}-Modell nach vier bis sechs Monaten zur Formation präneoplastischer hepatischer Läsionen mit konsekutiver Progression bis hin zu metastasierenden Tumoren [110, 119, 120]. Inwiefern miR-199a-3p in der Genese hepatobiliärer Tumoren eine regulatorische Aufgabe besitzt, wird aktuell diskutiert, bisherige Studien zeichnen diesbezüglich ein komplexes Bild. Eine verstärkte Expression von miR-199a wurde beispielsweise in Tumorerkrankungen der Gallenwege postuliert [223]. In der Entstehung von Magenkarzinomen wurde diese microRNA ebenfalls als proliferations- sowie metastasenfördernd beschrieben

[224]. Demgegenüber stehen Studien, welche sich mit der microRNA-Expressionsanalyse im humanen hepatozellulären Karzinom sowie im Hepatoblastom beschäftigen und jeweils eine verminderte Expression von miR-199a feststellen [225]. Diese gegensätzlichen Aussagen lassen in Bezug auf die Rolle von miR-199a-3p in der Tumorgenese in unseren verwendeten Mausmodellen keine abschließende Bewertung zu. Auch in dieser Hinsicht sind weitere Analysen an Tumorgewebe selbst und präneoplastischen Läsionen notwendig.

4.2.2 MiR-182-5p

In der PCR-Array-Analyse zeigte miR-182-5p in den 16 Wochen alten Hybridmäusen mitunter die stärkste Expressionsänderung der mit dieser Methode erfassten microRNA. Die Daten der Messpunkte 8, 16, 26 sowie 52 Wochen verdeutlichen, dass diese microRNA in allen drei analysierten Mausmodellen hochreguliert ist. Im Vergleich von HBV-transgenen Mäusen mit den ABCB4-defizienten Tieren zeigt sich, dass auch die Expression dieser microRNA in der letzteren Gruppe stärker zunimmt. Ähnlich wie bei miR-199a-3p scheint auch in diesem Fall ein verstärkender Effekt im Hybrid-Modell vorzuherrschen. Nach 8 sowie 52 Wochen lässt sich im Vergleich der unterschiedlichen Modelle jeweils eine Steigerung der Expression von miR-182-5p feststellen. Auch hier zeigt das HBVTg-Modell die geringste Expressionsänderung, gefolgt von dem ABCB4^{-/-}-Modell und zuletzt dem Hybridmodell.

Die Expressionsänderung dieser microRNA ist insbesondere im Hinblick auf die Tumorgenese und die Formierung von Metastasen interessant. Die bisherige Studienlage schreibt miR-182-5p hauptsächlich eine prokanzerogene Wirkung zu. Es konnte gezeigt werden, dass diese microRNA den Wnt-beta-catenin-Signalweg beeinflusst und so die Entstehung von Blasenkrebs fördert [226]. Weitere Studien kommen zu dem Ergebnis, dass miR-182-5p auch Metastasierungen begünstigt. Eine prometastatische Funktion wird sowohl in der Transformation des primären zum metastatischen Melanom als auch in verschiedenen Sarkom-Subtypen beschrieben [227]. Eine Überexpression dieser microRNA führte zu vermehrter pulmonaler Metastasierung der Versuchstiere. Passend dazu führte eine Deletion des miR-182-5p-Gens zu einer verminderten Metastasierung und unterstreicht so die Rolle dieser microRNA in der Entwicklung von Satellitenläsionen [228].

In Hinblick auf die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Modelle zeigen diese Publikationen, dass miR-182-5p in der Tumorentstehung und insbesondere der Metastasierung, wie sie beispielsweise im ABCB4^{-/-}-Modell beschrieben wurde, eine Rolle spielen könnte [229]. Mit den durchgeführten Expressionsanalysen konnten wir eine Hochregulation von

miR-182-5p zu allen erfassten Zeitpunkten in den ABCB4-defizienten Mäusen und eine zusätzlich gesteigerte Regulation im Hybridmodell zeigen, sodass ein Zusammenhang mit der Entwicklung hepatischer Neoplasien mit konsekutiver Metastasierung möglich erscheint.

Im Vergleich zu ABCB4^{-/-}-Mäusen ist die Expression in dem Mausmodell mit Überexpression von HBs schwächer ausgeprägt. Es ist möglich, dass aufgrund der geringeren pathologischen Befunde im HBV-Modell eine Korrelation zum Expressionsniveau von miR-182-5p besteht. Nichtsdestotrotz sind die der Tumorgenese respektive der Metastasierung zugrundeliegenden Mechanismen im Hinblick auf die Einflussnahme von miR-182-5p auf einzelne Signalwege größtenteils ungeklärt.

4.2.3 MiR-21a-5p

Expressionsanalysen von miR-21 ergaben in unterschiedlichsten onkologischen Erkrankungen eine Regulation. So zeigt sich bei Glioblastomen [230], Mamma-, Kolon-, Lungen-, Pankreas-, Prostata- oder Magenkarzinomen [231, 232], HCC [233], verschiedenen gynäkologischen Tumoren [234, 235] oder Schilddrüsenkarzinomen [236] eine verstärkte Expression. Diese Beobachtung führte zu der Vermutung, dass miR-21 eine onkogene Aktivität besitzen könnte. Gestützt wird diese Vermutung durch eine Studie, welche zeigte, dass verschiedene Tumorsuppressoren Zielsequenzen für miR-21 aufweisen [237]. In unseren Analysen zeigt sich bereits im PCR-Array eine mehr als dreifache Hochregulation in den 16 Wochen alten Hybridtieren, welches mittels qRT-PCR validiert werden konnte. In der Zusammenschau sämtlicher erfasster Messzeitpunkte dieses Modells ist dieser Wert der höchste im Langzeitverlauf: Nach 8 Wochen lässt sich eine 1,54-fache, nach 52 Wochen eine 1,98-fache Hochregulation nachweisen. Interessant im direkten Vergleich zwischen den beiden Modellen mit entweder einer kombinierten oder einer solitären ABCB4-Defizienz ist der annähernd gleiche Verlauf der Expressionsänderung. Demgegenüber steht lediglich eine moderate Regulation dieser microRNA im HBVTg-Modell im Alter von 8 Wochen - im höheren Alter ist die Expression mit dem Wildtyp vergleichbar. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine verstärkte Expression von miR-21 hauptsächlich auf den Knockout des ABCB4-Gens respektive der damit verursachten Pathologie zurückzuführen ist. Nach aktueller Studienlage erscheinen drei Szenarien plausibel: Möglicherweise kommt in den Mausmodellen tatsächlich eine onkogene Wirkung dieser microRNA zum Tragen. Für diese Theorie spricht die Entwicklung von Tumoren in beiden Modellen mit ABCB4-Defizienz. Passend zu den Expressionsunterschieden ist zudem die im Vergleich höhere Penetranz von Läsionen in dem Hyb-

ridmodell [229]. Andererseits ist es möglich, dass miR-21-5p im Rahmen der sklerosierenden Cholangitis bereits in der frühen Entstehungsphase eine profibrotische Wirkung besitzt. Beschrieben wurde eine solche Funktion bereits in verschiedenen in-vitro- als auch in-vivo-Modellen [210, 211]. Die dritte Möglichkeit ist die Beteiligung von miR-21-5p zunächst an der Entstehung von Fibrose mit einer nachfolgenden Rolle in der Tumorgenese. Für diese Theorie spricht, dass diese microRNA sowohl in dem ABCB4^{-/-}-Modell als auch in den Tieren des Hybridmodells bereits im Alter von 8 und 16 Wochen eine verstärkte Expression aufweist, Tumore hingegen erst im höheren Alter von 26 beziehungsweise 52 Wochen beobachtet werden [1].

4.2.4 MiR-122-5p

Im Vergleich zu den beiden zuvor diskutierten microRNA zeigte miR-122 in der micro-Array-Analyse zwar eine statistisch signifikante, allerdings mit einer Hochregulation um den Faktor 1,54 in der Probe der 16 Wochen alten Hybridmäuse verhältnismäßig schwach ausgeprägte Änderung der Expression. Die Validierung dieser Ergebnisse mittels qRT-PCR ergab sogar eine leichte Expressionsminderung, welche sich auch zu den weiteren Messzeitpunkten feststellen ließ. So schwankte die Regulation von miR-122-5p in dem Hybridmodell von einer um den Faktor 0,80 verminderten Expression im Alter von 8 Wochen über eine 0,95-fach beziehungsweise 0,84-fach verminderte Expression in den 16 respektive 52 Wochen alten Tieren. Ein vergleichbares Bild lässt sich bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufes dieser microRNA in dem ABCB4^{-/-}-Modell erkennen, jedoch ist die Expressionsminderung im Vergleich zu dem Hybridmodell zu den gemeinsamen Messzeitpunkten 16 und 52 Wochen geringer ausgeprägt. Dieser Verlauf lässt sich auch in diesem Fall möglicherweise mit der doppelten Schädigung (cholestase und HBs Überexpression) begründen. Gestützt wird diese Hypothese durch die Expression von miR-122-5p in dem HBs-transgenen Mausmodell. Hier zeigt sich insbesondere im Alter von 8 Wochen eine verminderte Expression dieser microRNA um den Faktor 0,51, welche im Alter 26 Wochen (0,61-fach) und 52 Wochen (0,70-fach) kontinuierlich geringer ausfällt. Aufgrund dieser Daten erscheint es möglich, dass - ähnlich wie bei den beiden zuvor diskutierten microRNA - beide Noxen einen Einfluss auf den Expressionslevel von miR-122 besitzen, welche in diesem Fall allerdings entgegengerichtet ausfallen.

Die Expressionsanalysen in den analysierten Mausmodellen zeigen, dass miR-122-5p zum Teil nur schwach reguliert wird. Allerdings ist zu bedenken, dass diese microRNA in der Leber nahezu 70% des gesamten Pools an hepatischer microRNA ausmacht, wie auch in den Array-Daten zu erkennen ist: Hier zeigt miR-122 mit einer Intensität von

15.854 in dem Hybridmodell sowie 10.273 in der Kontrolle das mit Abstand stärkste Signal. Im Umkehrschluss ist dementsprechend fraglich, ob aufgrund der quantitativen Masse dieser microRNA eine extreme Expressionsänderung in in-vivo-Modellen überhaupt vorkommt und ob, beziehungsweise bis zu welchem Grad, Signalwege beeinflusst werden, welche auch bei geringen relativen Expressionsänderungen von miR-122 moduliert werden.

Im Hinblick auf unsere erhobenen Daten zeigt sich eine Kohärenz zu der aktuellen Studienlage. Eine verminderte Expression dieser microRNA wurde bereits in 6 bis 8 Wochen alten HBV-transgenen Mäusen beschrieben [238]. Der Grund ist möglicherweise in einer spezifische Sequenz zu suchen, welche in allen vier mRNA (und damit auch in präS1 im hier verwendeten HBVTg-Modell) des Hepatitis-B-Virus vorkommt. Durch diese Sequenz wird miR-122 gebunden und der eigentlich replikationshemmende Einfluss dieser microRNA begrenzt [239].

Eine verminderte Expression von miR-122 wurde zudem in zahlreichen Studien mit der Entwicklung von hepatischen Erkrankungen beschrieben. So zeigte sich, dass miR-122 in einem Mausmodell für NASH (nichtalkoholische Steatohepatitis) sowie in Analysen von Leberproben von NASH-Patienten eine reduzierte Expression aufweist [240, 241]. Ebenso wurde in einem CCl₄-induzierten Fibrosemodell eine verminderte Expression gezeigt [242], was für eine mögliche Rolle dieser microRNA in der Entstehung entzündungsbedingter Fibrose spricht. Diese Vermutung wird zusätzlich durch die Beobachtung gestärkt, dass eine Wiederherstellung von miR-122 auf ein physiologisches Niveau mittels Adeno-assoziierten Vektoren eine partielle Reversibilität dieser Entzündung bewirkte [243]. Auch mit der Ätiopathogenese des hepatozellulären Karzinoms wird miR-122 assoziiert. Hierbei korreliert eine verminderte Expression mit einer schlechten Prognose sowie Metastasenbildung [244].

In der Zusammenschau des aktuellen Wissenstandes mit den von uns erhobenen Ergebnissen lässt sich festhalten, dass die Beteiligung von miR-122-5p an der Entstehung und Modulation der im Rahmen dieser Arbeit analysierten hepatischen Pathologien wahrscheinlich ist. Unsere Analyse zeigt, dass miR-122-5p auch im Langzeitversuch dauerhaft vermindert vorliegt, unabhängig vom jeweiligen Mausmodell. Diese Beobachtung wirft die Frage auf, ob in Abhängigkeit von dem ABCB4-Gen-Knockout beziehungsweise der Überexpression von HBs unterschiedliche Trigger zu einer verminderten Expression der gleichen microRNA führen können. Betrachtet man die erwähnten Publikationen, erscheint sowohl in dem ABCB4^{-/-}- als auch im HBVTg-Modell eine verminderte Regulation spezifisch für die jeweilige Pathologie zu sein.

Auch in der Langzeitanalyse des HBV-transgenen Mausmodelles zeigte miR-122-5p eine stetige Expressionsminderung. Dies korrespondiert mit der Beobachtung, dass

diese microRNA in 6 bis 8 Wochen alten HBVTg-Mäusen vermindert vorliegt. Es wird vermutet, dass miR-122 im Laufe einer HBV-Infektion durch virale mRNA gezielt gebunden wird und die antivirale Wirkung abschwächt. Das Resultat dieses Mechanismus ist eine Persistenz der viralen mRNA respektive der viralen Proteine [238]. Auf der anderen Seite wies auch das ABCB4^{-/-}-Modell in einem Großteil der untersuchten Zeitpunkte eine verminderte Expression von miR-122 auf und stützt somit die Vermutung als regulatorisches Element im Rahmen von Entzündung, Fibrose sowie der konsekutiven Entstehung von Tumoren. Diese Feststellung zeigt letztendlich, dass eine microRNA in Abhängigkeit verschiedener Pathologien in der Lage ist, entweder unterschiedliche Funktionen zu vermitteln oder dass die jeweiligen Erkrankungen Gemeinsamkeiten auf Ebene der aktivierten Signalwege besitzen. Zugleich wird damit erneut demonstriert, dass die Einflussnahme von microRNA äußerst komplex ist.

4.2.5 MiR-23a-3p

MiR-23a liegt im Genom mit miR-27a sowie miR-21-2 gemeinsam in einem Cluster auf Chromosom 19p13 vor. Dies bedeutet, dass diese drei Sequenzen gemeinsam transkribiert werden. Zudem befindet sich mit dem miR-23b~27b~24-1-Cluster ein Paralog auf Chromosom 9q22 [245, 246]. In unseren Analysen zeigte sich, dass die im micro-Array erfassten miR-23a sowie miR-23b gleichsinnig hochreguliert waren (4,34-fach sowie 3,58-fach), passend dazu wiesen auch miR-27a sowie miR-27b eine verstärkte Expression auf. Sowohl der miR-23a~27a~24-2-Cluster als auch der miR-23b~27b~24-1-Cluster wurden bisher hauptsächlich mit der Entstehung von malignen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Interessanterweise zeigen beide miR-23-Isoformen in Erkrankungen wie der akuten lymphatischen Leukämie oder akuten myeloischen Leukämie [247], dem Blasenkarzinom [248], dem Magen-Karzinom [249, 250] sowie dem hepatozellulären Karzinom [251, 252] eine gleichgerichtete Regulation, was ein Hinweis dafür sein kann, dass in der Pathogenese dieser Krankheiten eine Deregulierung beider microRNA der Fall ist.

In der von uns durchgeführten Langzeitanalyse ist die Expression von miR-23a zwischen den einzelnen Mausmodellen sowie auch teilweise von Zeitpunkt zu Zeitpunkt sehr inhomogen. Zeigt sich nach 8 Wochen eine Hochregulation dieser microRNA in allen drei Mausmodellen, weist im Alter von 16 Wochen das ABCB4^{-/-}-Modell eine deutliche Expressionsminderung im Vergleich zum Wildtyp auf. Demgegenüber steht eine fast doppelt so starke Expression im Hybridmodell. Insbesondere die verminderte Expression ist auffällig, allerdings lässt sich über den Grund nur spekulieren. Auch im weiteren Verlauf sind deutliche Diskrepanzen auszumachen. Ab 16 Wochen steigt das Niveau von miR-

23a in dem ABCB4^{-/-}-Modell stetig auf die maximale Expressionsänderung von 3,07-fach im Alter von 52 Wochen an. Im Hybridmodell liegt die maximale Expression im Alter von 16 Wochen vor und geht auf eine 1,5-fache Regulation zurück, welche vergleichbar mit dem HBVTg-Modell ist, in dem global betrachtet lediglich eine geringe Regulation vorliegt. Ein Ziel von miR-23a sind mehrere zentrale Signalproteine des TGF- β -Signalweges. Es wurde bereits vermutet, dass solch eine Modulation über die Ausschaltung der TGF- β -vermittelten Tumorsuppression entscheidend zur Pathogenese des HCC beiträgt [251]. Auch hier ist wieder die Co-Regulation von miR-23b als verstärkendes Element zu beachten, da aus evolutionären Gründen eine enge Kontrolle dieses zentralen Signalweges durch mehrere Paraloge sichergestellt wird und eine pathologische Deregulierung von zwei Modulatoren umso gravierendere Auswirkungen hat. Hinzu kommt, dass mit miR-122 eine weitere microRNA mit Beteiligung am TGF- β -Signalweg eine Expressionsänderung aufweist und zusätzliche Effekte vermittelt. Insgesamt lässt sich vermuten, dass miR-23a zumindest in den Mausmodellen mit einem Knockout des ABCB4-Gens zur Entstehung von Tumoren beziehungsweise Modulation der Entzündung beiträgt.

4.2.6 MiR-101a-3p

Als eine von wenigen microRNA wurde miR-101a-3p sowohl im PCR- als auch im micro-Array erfasst und zeigte jeweils eine verminderte Expression, welche sich allerdings in Abhängigkeit der Methode unterschied. So war im PCR-Array die Expression um den Faktor 1,37 vermindert, im micro-Array zeigte sich hingegen eine mehr als 4-fach verminderte Regulation.

Die Effekte von miR-101-3p wurden in zahlreichen Studien untersucht und im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Erkrankungen diskutiert. So wurde eine mögliche Beteiligung durch eine verminderte Expression an der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen, beispielsweise im Rahmen kardialer oder hepatischer Fibrose postuliert [253] [254]. In einem CCl₄-induzierten Fibrosemodell konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression von miR-101 durch Regulierung des TGF- β -Rezeptors und der damit verbundenen Modulation des TGF- β -Signalweges antifibrotisch wirkt [255]. Eine weitere Studie weist dieser microRNA zudem eine onkogene Rolle in der Entstehung des Hepatitis-B-assoziierten hepatozellulären Karzinoms zu [256], darüber hinaus wurde auch nachgewiesen, dass miR-101 in humanen HCC-Gewebe als auch in unterschiedlichen Hepatom-Zelllinien vermindert exprimiert wird und dadurch zum einen die Zellformierung in vivo und zum anderen das Tumorwachstum in vivo inhibiert wird [257].

Auch in unseren analysierten Mausmodellen zeigt sich im Verlauf eine reduzierte Expression von miR-101a-3p mit maximaler Ausprägung nach 16 Wochen (ABCB4^{-/-}-Modell) respektive 26 Wochen (HBVTg-Modell), was für eine mögliche Beteiligung dieser microRNA an Fibrose und Karzinogenese spricht.

Im Alter von 52 Wochen insbesondere in dem ABCB4^{-/-}-Modell zeigt sich eine letztendlich verstärkte miR-101a-3p Expression. Auch das HBVTg-Modell erreicht ein dem Wildtyp vergleichbares Niveau. Möglicherweise kommt hier ein weiterer von miR-101a-3p vermittelter Effekt zum Tragen. Wie alle zuvor diskutierten microRNA scheint auch miR-101a-3p im Rahmen von verschiedenen onkologischen Erkrankungen reguliert zu werden [258–260] und vermittelt sowohl tumorsuppressive als auch antimetastatische Wirkungen [261, 262]. Aus diesem Grund ist diese microRNA in unseren analysierten Modellen insbesondere im Langzeitverlauf interessant. Die gemessenen Expressionsänderungen im Alter von 52 Wochen sind in ihrer Interpretation schwierig zu bewerten, da sich keine klare Tendenz abzeichnet. Eine Möglichkeit ist, dass miR-101a-3p zu diesem Zeitpunkt durch die gesteigerte Expression keine tumorsuppressive Wirkung mehr vermittelt und somit zumindest in dem ABCB4^{-/-}-Modell zur malignen Transformation beiträgt. Demgegenüber steht die weiterhin verminderte Expression zum gleichen Zeitpunkt in dem Hybridmodell, welches auch Tumore entwickelt. Diese beiden Beobachtungen stehen in Gegensatz zueinander und konnten zumindest durch unsere Analysen nicht abschließend geklärt werden.

4.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit

4.3.1 Verwendete Tiermodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden microRNA-Expressionsanalysen in drei unterschiedlichen Mausmodellen mit hepatischen Pathologien vorgenommen. Der tierexperimentelle Ansatz bietet im Hinblick auf die Aussagekraft Vorteile im Vergleich zu in-vitro Modellen, da einerseits der physiologische Verbund von verschiedenen Zelltypen mit ihren spezifischen Aufgaben erhalten ist, andererseits ist zudem die Interaktion von organfremden Zellen wie beispielsweise Vertretern des Immunsystems möglich. Hinzu kommt, dass in Zellkulturen häufig spezifische microRNA überexprimiert werden, sodass diese nicht-physiologische Niveaus erreichen, welche in einem in-vivo-Modell nicht möglich wären. Trotz der Vorteile des Mausmodells und den damit einhergehenden investigativen Möglichkeiten muss man festhalten, dass eine vollständige Übertragbarkeit der erhaltenen Ergebnisse auf den humanen Organismus nicht gegeben ist.

Eine weitere Limitation besteht in der Auswahl der jeweiligen Tiere und der analysierten Zeitpunkte. In der hier vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die Bildung von gepoolten Proben aus Lebern von weiblichen Versuchstieren im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen. Das Pooling ist zwar aus ökonomischer Sicht sinnvoll, jedoch nimmt man damit in Kauf, dass interindividuelle Differenzen der Expression verfälscht werden. Hinzu kommt, dass die Möglichkeit einer statistischen Auswertung durch diese Entscheidung eingeschränkt wurde. Dennoch ist diese Auswahl ausreichend, um ein grobes Bild der Expressionsänderungen zu zeichnen. Die Beschränkung auf weibliche Tiere ergab sich aus der Tatsache, dass diese im Vergleich zu ihren männlichen Artgenossen eine weit aus geprägte Leberschädigung aufwiesen [263]. Die Analyse von männlichen Tieren und ein geschlechtsspezifischer Vergleich hätten den Umfang dieser Arbeit überschritten, sind aber unbestreitbar für zukünftige Analysen interessant. Auch im Hinblick auf die ausgewählten Zeitpunkte sind Limitationen einzuräumen. Insgesamt wurden in Abhängigkeit des jeweiligen Modells mindestens drei (HBVTg- und Hybridmodell) beziehungsweise maximal vier (ABC4^{-/-}-Mäuse) Zeitpunkte ausgewertet. Mit einer engeren Staffelung der zeitlichen Abstände sowie einer Analyse von sämtlichen Mausmodellen zu den jeweiligen Zeitpunkten hätten Änderungen der microRNA-Expression genauer aufgezeigt werden können und sich eine höhere Vergleichbarkeit der Gruppen ergeben, jedoch wäre diese Maßnahme mit einer steigenden Anzahl von Versuchstieren verbunden, welche durch die aufwendige Haltung und Zucht limitiert ist.

4.3.2 Verwendete Analysemethoden

Eine weitere Limitation besteht in den verwendeten Analysemethoden. Zum initialen Screening wurde ein micro-Array durchgeführt und einzelne microRNA später mittels qRT-PCR validiert. Diese beiden Methoden werden zur Evaluation von microRNA häufig genutzt, weisen allerdings in Abhängigkeit des verwendeten Probematerials und der Expressionsstärke Unterschiede auf.

So konnte beispielsweise in Arbeiten mit Zellpopulationen eine gute Korrelation gezeigt werden [264, 265]. Andererseits zeigte sich in Expressionsanalysen aus murinem Gewebe eine geringe Korrelation, insbesondere bei schwacher Expression [266, 267]. Passend hierzu kamen auch weitere Studien mit humanem Gewebe zu einer niedrigen Korrelation [268–271].

Die möglichen Ursachen hierfür sind mannigfaltig. Zunächst verfügt die qRT-PCR über einen größeren dynamischen Bereich als die micro-Array-Analyse (7 log vs. 3-4 log) [267, 272], was eine höhere Sensitivität zur Folge hat. Durch Primer-bedingte Unterschiede beider Techniken scheint zudem die qRT-PCR zusätzlich eine höhere Spezifität aufzuweisen. [273]. Durch minimale Unterschiede in Länge und Guanosin- und Cytosin-Gehalt weisen microRNA unterschiedliche Schmelzpunkte auf [274], sodass im Rahmen der Hybridisierung falsch-positive oder falsch-negative Ergebnisse entstehen können [264].

Insgesamt ist die Kombination beider Verfahren jedoch eine adäquate und anerkannte Methode zur Erfassung von Expressionsänderungen bekannter microRNA [275].

Eine klare Einschränkung beider Methoden besteht darin, dass lediglich bekannte und vorher definierte microRNA erfasst werden. Eine vollständige Erfassung aller microRNA wird daher erst möglich sein, wenn alle Sequenzen bekannt und mittels Analysemethoden erfassbar sind.

4.3.3 Thematik im Hinblick auf den aktuellen Forschungsstand

Zuletzt muss die Thematik dieser Arbeit in den aktuellen Forschungsstand eingeordnet werden. Die Klasse der microRNA ist noch verhältnismäßig jung und größtenteils unverstanden. Hinzu kommt die Dynamik, mit der neue microRNA entdeckt werden. Mit unseren Analysen konnten insgesamt ca. 1900 verschiedene microRNA erfasst werden, welche, verglichen mit der aktuellen Zahl an bekannten microRNA, lediglich einen geringen Teil darstellen. Es ist aus diesem Grund möglich, dass bislang nicht erfasste microRNA in den von uns analysierten Mausmodellen reguliert werden und eine Rolle in der Pathogenese spielen.

4.4 Zusammenfassung

MicroRNA beeinflussen auf posttranskriptioneller Ebene die Proteinsynthese und sind in einer Vielzahl von Signalwegen sowie Prozessen involviert. Insbesondere bei Tumorerkrankungen wurde eine veränderte Expression spezifischer microRNA gezeigt, allerdings ist die genaue Funktion in der Entstehung und Modulation von Pathologien größtenteils unverstanden. In dieser Arbeit erfolgten microRNA-Expressionsanalysen im murinen Langzeit-Modell mit verschiedenen hepatischen Erkrankungen. Hierzu wurden Inzuchtmäuse des genetischen Hintergrundstammes BALB/c im Alter von 8, 16, 26 sowie 52 Wochen untersucht. Das erste Modell (ABCB4^{-/-}) mit Knockout des ABCB4-Gens entwickelt im Rahmen einer sklerosierenden Cholangitis durch chronische Cholestase eine Leberfibrose und Tumore. Das zweite Modell (HBVTg) weist eine Überexpression und Akkumulation des Hepatitis-B-Oberflächenantigens LHB auf und bildet eine Pathologie, vergleichbar einer chronischen HBV-Infektion. Im Verlauf entwickeln diese Tiere das Bild einer chronischen Hepatitis sowie hepatozelluläre Tumore. Das dritte verwendete sogenannte Hybrid-Mausmodell (HBVTg-ABCB4^{-/-}) ist eine Kombination der beiden vorherigen und zeichnet sich insbesondere durch eine erhöhte Tumorinzidenz aus. Mit Array-Analysen wurden 1900 microRNA in 16 Wochen alten, weiblichen Mäusen des Hybridmodells analysiert. 51 microRNA wiesen eine signifikant verstärkte, 69 eine verminderte Expression auf. Sechs microRNA (miR-199a-3p, miR-182a-5p, miR-21a-5p, miR-122-5p, miR-23a-3p, miR-101a-3p) wurden mittels qRT-PCR analysiert. MiR-199a-3p wurde sowohl im HBVTg- und vor allem im ABCB4^{-/-}-Modell verstärkt und im zeitlichen Verlauf zunehmend exprimiert. Im Hybridmodell ergab sich ein synergistischer Effekt beider Pathologien und die größte Zunahme der miR-199a-3p Expression. MiR-182a-5p zeigte im ABCB4^{-/-}- und Hybridmodell eine globale Expressionsverstärkung, wobei der Effekt zum Zeitpunkt von 16 und 26 Wochen am stärksten ausgeprägt war. Das HBVTg-Modell hingegen wies einen nahezu linearen Anstieg des Expressionslevels auf. MiR-21a-5p zeigte im ABCB4^{-/-}- und im Hybridmodell eine Hochregulation, wohingegen im HBVTg-Modell nahezu keine Änderung der Expression zu verzeichnen war. Die leberspezifische miR-122-5p zeigte mit Ausnahme der 16 Wochen alten ABCB4^{-/-}-Mäuse eine global verminderte Expression, welche im HBVTg-Modell am stärksten ausgeprägt war. Eine inhomogene Expressionsänderung im zeitlichen Verlauf wies miR-23a-3p auf. Es ergab sich eine nahezu gleichbleibend erhöhte Expression im HBVTg-Modell sowie ein undulierender Verlauf des erhöhten Expressionslevels im Hybridmodell mit maximaler Ausprägung im Alter von 16 Wochen. Ein anderes Bild zeigte sich im ABCB4^{-/-}-Modell mit verminderter Expression zum Zeitpunkt 16 Wochen und progredienter Expressionsverstärkung mit zunehmendem Alter der Versuchstiere.

Die Expressionsänderung von miR-101a-3p wiesen im ABCB4^{-/-}- und HBVTg-Modell einen vergleichbaren Verlauf auf. Einer initial minimal bestehenden Verstärkung folgte zum Zeitpunkt 16 bzw. 26 Wochen eine verminderte Expression mit nachfolgendem Anstieg auf einen dem Wildtyp vergleichbarem Ausgangswert (HBVTg) bzw. vermehrte Expression (ABCB4^{-/-}). Im zeitlichen Verlauf ergibt sich im Hybridmodell eine stetig sinkende Expression.

Letztendlich konnte mit der Arbeit gezeigt werden, dass in den unterschiedlichen Lebermodellen in Abhängigkeit von Ätiologie und Zeitverlauf spezifische microRNA reguliert werden.

4.5 Summary

MicroRNA affect protein synthesis at the post-transcriptional level and are involved in a variety of signaling pathways as well as processes. Especially in carcinogenesis an altered expression of specific microRNA has been shown. However, the exact function in formation and modulation of pathologies is not well understood. In this work, microRNA expression analysis was performed in murine long-term models of various hepatic diseases. For this purpose, mice of the genetic background BALB/c at the age of 8, 16, 26 and 52 weeks were examined. The first murine model (ABCB4^{-/-}) with knockout of the ABCB4 gene develops liver fibrosis and tumors caused by cholangitis and chronic cholestasis. The second model (HBVTg) with transgenic overexpression and accumulation of HBsAg constitutes a pathology comparable to a chronic HBV infection. Over time, these animals develop the picture of chronic hepatitis and tumors as well. The third mouse model used (HBVTg-ABCB4^{-/-}), a combination of the previous ones, is characterized in particular by an increased tumor incidence. Array analyses were used to assess 1.900 microRNA in 16-week-old female mice of the hybrid model. 51 microRNAs showed a significantly increased, 69 a reduced expression. Six microRNA (miR-199a-3p, miR-182a-5p, miR-21a-5p, miR-122-5p, miR-23a-3p, miR-101a-3p) were analyzed by qRT-PCR. Expression level of miR-199a-3p was elevated in both the HBVTg and especially in the ABCB4^{-/-} model and showed an increase over time. The hybrid model showed a synergistic effect of both pathologies and the largest increase in expression. MiR-182a-5p showed a global expression enhancement in the ABCB4^{-/-} and hybrid model, with the most pronounced effect at 16 and 26 weeks. In contrast, the HBVTg model showed a nearly linear increase in miR-182a-5p expression level. MiR-21a-5p was upregulated in the ABCB4^{-/-} and hybrid model, whereas in the HBVTg model almost no expression changes could be observed. The liver-specific miR-122-5p showed globally diminished

expression especially in the HBVTg model. However, in 16-week-old ABCB4^{-/-} mice a minimal increase of miR-122-5p was observed.

Inhomogeneous expression changes over time of miR-23a-3p were seen. There was an almost constant increased expression in the HBVTg model as well as an undulatory course of the likewise increased expression level in the hybrid model with maximal expression at the age of 16 weeks. In contrast, the ABCB4^{-/-} model showed reduced expression at the time point of 16 weeks with an increase at later timepoints.

The expression changes of miR-101a-3p showed a similar course in the ABCB4^{-/-} and HBVTg models. An initially minimally elevated level was followed by a reduced expression at 16 and 26 weeks with a subsequent increase to a wild-type comparable baseline (HBVTg) or slightly increased expression (ABCB4^{-/-}). Over time, the hybrid model shows a steadily declining expression.

Our data show that specific microRNAs are regulated in different liver pathologies depending on age and the respective etiology.

4.6 Ausblick

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Studien publiziert, welche sich mit dem Expressionsmuster von microRNA beschäftigen. Das Ziel dieser Analysen besteht einerseits darin, die Rolle dieser Klasse von RNA-Molekülen in der Entstehung sowie Modulation verschiedener Erkrankungen zu definieren, andererseits besitzen microRNA mit der von ihnen vermittelten Regulation auf posttranskriptioneller Ebene ein großes Potenzial als Therapeutika. Darüber hinaus wird auch eine Funktion als Biomarker diskutiert. Untersuchungen zeigen, dass microRNA nahezu in jeder Erkrankung in ihrer Expression verändert sind, was ihnen eine bedeutende Rolle zukommen lässt. Dieses unbestritten große Potenzial von microRNA kann zum aktuellen Zeitpunkt allerdings noch nicht adäquat genutzt werden.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde ein Beitrag zum Verständnis der Rolle von microRNA im Rahmen hepatischer Erkrankungen geleistet. Die von uns durchgeführten Analysen in Mausmodellen für die sklerosierende Cholangitis (ABCB4^{-/-}-Modell) sowie einem Modell mit Überexpression von Oberflächenproteinen des Hepatitis-B-Virus (HBVTg-Modell) zeigen, dass verschiedene microRNA in diesen Erkrankungen reguliert werden. Diese Ergebnisse könnten die Grundlage weiterer Untersuchungen darstellen. Beispielsweise wäre ein Mausmodell mit einer Überexpression von miR-199a-3p zur Untersuchung der Entwicklung einer Leberfibrose interessant. Eine Überexpression von miR-182-5p oder ein Knock-Out des miR-122-Gens hingegen könnten im Hinblick auf die Metastasenformierung weitere Hinweise geben. Ein interessanter Ansatz wäre zudem die gezielte Modulation von microRNA mit regulatorischem Einfluss auf den TGF- β -Signalweg. Auch hier wäre eine Überexpression des miR-23a~27a~24-2-Clusters mit einem simultanen Knockdown des miR-122-Gens denkbar. Zudem könnte die Untersuchung einer gleichzeitigen Überexpression des 23a~27a~24-2-Clusters und des korrespondierenden miR-23b~27b~24-1-Cluster eine Möglichkeit darstellen, die Effekte von microRNA auf diesen zentralen Signalweg zu untersuchen.

Trotz der Fortschritte auf dem Gebiet der microRNA sollte man sich klarmachen, dass die Effekte dieser RNA-Moleküle durch Bindung an eine ihrer zahlreichen Zielsequenzen größtenteils noch unverstanden sind. Hinzu kommt, dass eine einzelne microRNA in der Lage ist, ein ganzes Netzwerk an Proteinen zu beeinflussen. Aus diesem Grund sollte man auch die regulatorischen Effekte dieser RNA-Moleküle nicht auf einzelne Signalwege oder Proteine beschränken, sondern hier die globale Einflussnahme auf die Translation bedenken. Dieser Umstand trägt entscheidend zur Komplexität dieses Feldes bei. Dennoch wurden in den letzten Jahren Erfolge verzeichnet, welche sich unter anderem im Einsatz von synthetischen Oligonukleotiden in Phase-I- und -II-Studien zeigen.

In naher Zukunft wird das Verständnis für die Bedeutung von microRNA im Rahmen verschiedenster Erkrankungen stetig zunehmen, allerdings bleibt abzuwarten, ob diese RNA-Moleküle auch in diagnostischer sowie therapeutischer Hinsicht die an sie gestellten hohen Erwartungen erfüllen können.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Geräte und Materialien

5.1.1 Geräte und Software

Tabelle 7 - verwendete Geräte und Software

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav 755 H+P Varioklav	Fa. H+P, Obeschleißheim, Deutschland
Brutschrank Jouan IG 150	Fa. Jouan, Unterhaching, Deutschland
Eismaschine Manitowoc Eismaschine	Fa. Manitowoc, New Port Richey, Florida, USA
Elektrophoresekammer HU6 Mini Horizontal	Fa. SCIE-PLAS, Cambridge, UK
Elektrophoresis Power Supply Consort EV243	Fa. Consort, Turnhout, Belgien
Feinwaage Sartorius A200S	Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C Liebherr GN 2856	Fa. Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C Sanyo MDF-U6086S	Fa. Panasonic, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationssystem Camag ReproStar 3	Fa. Camag, Muttenz, Schweiz
Homogenisator IKA Ultra-Turrax T8	Fa. IKA, Staufen, Deutschland
Kühlschrank 4 °C Liebherr FKS 5000	Fa. Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikrowelle Severin 900 & Grill	Fa. Severin, Sundern, Deutschland
Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette Eppendorf Multipipette plus	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Tube Capping Tool	Fa. BioRad, Hercules, California, USA

Tabelle 8 - verwendete Geräte und Software (Fortsetzung)

Bezeichnung	Hersteller
Real-Time-PCR-System Applied Biosystems StepOnePlus	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Real-Time-PCR-Software AB StepOne Software v2.2	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Spektrophotometer Thermo Scientific NanoDrop 1000	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Spektrophotometer-Software Thermo Scientific ND-1000 v3.3.7	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stickstofftank Linde CRYO SPEED MED	Fa. Linde, München, Deutschland
Stickstoffbehälter, transportierbar	Fa. KGW, Karlsruhe, Deutschland
Thermocycler Biometra T3000	Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer Eppendorf Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
USB-Kamera Phytec AK 901 mono 5mpix	Fa. Phytec, Mainz, Deutschland
USB-Kamera-Software Phytec Vision Demo v2.2	Fa. Phytec, Mainz, Deutschland
Vortex-Mixer IKA VF-2	Fa. IKA, Staufen, Deutschland
Waage Faust FA 1500-2	Fa. Faust, Schaffhausen, Schweiz
Reinstwasseranlage Milli-Q-Biocel und Elix-3UV	Fa. Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Roth Rotilabo Mini Zentrifuge	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge Hettich Mikro 120	Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Hettich Mikro 200R	Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland

5.1.2 Kommerzielle Kits

Tabelle 9 - verwendete kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
miRNeasy mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TaqMan Universal Master Mix II, no UNG	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mouse miFinder microRNA PCR-Array MIMM-001Z	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
miScript II RT Kit	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	Fa. Qiagen, Hilden, Deutschland

5.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10 - verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Flüssigstickstoff	Fa. Linde, Pullach, Deutschland
Handschuhe Ansell NitraTex	Fa. Ansell, Brüssel, Belgien
Parafilm „M“	Fa. Pechiney, Chicago, Illinois, USA
PCR-Reaktionsgefäße MicroAmp Fast Reaction Tubes	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-Reaktionsgefäß-Verschlusskappen MicroAmp Optical 8-cap strip	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Pipettenspitzen	Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Multipipette Ritips professional 0,5 ml	Fa. Ritter, Schwabmünchen, Deutschland
Reaktionsgefäße Falcon, 15 ml, 50 ml	Fa. Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Safe Lock Tubes, 0,5 ml, 1,5 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterican Kanüle, 30G	Fa. B. Braun, Melsungen
Trockeneis	Apotheke der Justus-Liebig-Universität Gies- sen

5.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11 - verwendete Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose Broad Range Pulver	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethylpolycarbonat (DEPC)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA, 0,5 M	Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland
Ethanol abs.	Apotheke der Justus-Liebig-Universität Gießen
Ethidiumbromidlösung 1%	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd min. 37%	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
HCl min. 37%	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
3-Morpholinopropansulfonsäure 99,5% (MOPS)	Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
0,9% Natriumchlorid	Fa. B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumacetat Sodium acetate trihydrate	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
RNA-Ladepuffer NorthernMax Formaldehyde Load Dye	Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNAseaway	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
RNAse-freies Wasser	Fa. Biorad, Hercules, USA
RPMI 1640 + 1 % FCS	Fa. PAN-Biotech, Aidenbach
TRIS-Pufferan	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland

5.1.5 TaqMan Primer-Assays

Tabelle 12 - Verwendete TaqMan-Assays und Sequenz der jeweiligen microRNA

Assay Name	Sequenz der reifen microRNA	Assay ID
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	000391
hsa-miR-27a-3p	UUCACAGUGGCUAAGUCCGC	000408
hsa-miR-27b-3p	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	000409
hsa-miR-34c-5p	AGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC	000428
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	002245
hsa-miR-141-3p	UAACACUGUCUGGUAAAAGAUGG	000463
mmu-miR-182-5p	UUUGGCAAUGGUAGAA- CUCACACCG	000597
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	002304
hsa-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC	000498
hsa-miR-210-3p	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	000512
hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	002306
mmu-miR-224-5p	UAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	002553
snoRNA-202	GCTGTACTGACTTGATGAAAGTA CTTTTGAACCCTTTTCCATCTGATG	001232

5.2 Mausmodelle

5.2.1 Übersicht der Mausmodelle sowie Zulassungsnummern

Tabelle 13 - Übersicht der verwendeten Mausmodelle

Bezeichnung	Erläuterung
C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J	HBV-transgene Mauslinie auf Bl/6-Hintergrund [276]
BALB/c-Wt („Wildtyp“)	Mauslinie auf BALB/c-Hintergrund. Wt (= Wildtyp) steht für Mäuse der Kontrollgruppe
BALB/c-Tg(Alb1HBV) („HBVTg“)	HBV-transgene Maus auf BALB/c-Hintergrund
BALB/c-ABCB4 ^{-/-} („ABCB4 ^{-/-} “)	Mauslinie auf BALB/c-Hintergrund mit Knock-Out des ABCB4-Gens
BALB/c-ABCB4 ^{-/-} -Tg(Alb1HBV) („HBVTg-ABCB4 ^{-/-} “)	HBV-transgene Mauslinie auf BALB/c-Hintergrund, welche zusätzlich einen Knock-Out des ABCB4-Gens aufweist

Jegliche für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden in dem Zentralen Tierstall der Justus-Liebig-Universität Giessen (ZTL, Frankfurter Straße 125, 35392 Giessen) unter festgelegten Erreger-freien Bedingungen gehalten. Die Untersuchungen wurden unter strikter Befolgung der Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Versuchstieren nach dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Mäuse wurden artgerecht gehalten und sämtliche Versuche wurden durch die Ethik-Kommission des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Giessen geprüft und genehmigt. Die Zulassungsnummern sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14 – Zulassungsnummer der einzelnen Mausversuche

Bezeichnung	Zulassungsnummer
BALB/c-Tg(ALB1HBV)	GI 20/10-Nr. 48/2012
BALB/c-ABCB4 ^{-/-}	GI 20/10-Nr. 57/2012 sowie 17/2011
BALB/c-ABCB4 ^{-/-} -Tg(ALB1HBV)	GI 20/10-Nr. 36/2011

5.2.2 Herkunft, genetische Abstammung sowie Kreuzung der Mausmodelle

5.2.2.1 BALB/c-Tg(Alb1HBV) und BALB/c-Wt

Die HBV-transgenen Mäuse wurden der AG Roeb freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Kurt Reifenberg, Leiter der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz zur Verfügung gestellt. Der genetische Hintergrund dieser Mauslinie war anfänglich C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J [276, 277]. Da diese Mäuse jedoch lediglich eine geringe spontane Leberfibrose entwickeln [278, 279], erfolgte die Rückkreuzung auf den fibrose-suszeptiblen genetischen Hintergrund BALB/c [186, 280, 281]. Durch mindestens sechs bis neun Rückkreuzungen von Mäusen des Stammes C57BL/6J-Tg(Alb1HBV)44Bri/J mit Mäusen des Stammes BALB/c entstanden die Mäuse der Bezeichnung BALB/c-Tg(Alb1HBV) sowie die korrespondierenden nicht-transgenen Mäuse (nicht-transgene Geschwister) mit der Bezeichnung BALB/c-Wt. Im Gegensatz zu den transgenen Mäusen der Fallgruppe entwickeln Wildtyp-Mäuse keine phänotypische Ausprägung einer Leberfibrose und können daher als Kontrollgruppe verwendet werden [282]. Die Tötung dieser Mäuse erfolgte nach 8, 26 und 52 Wochen (siehe 5.2.3).

5.2.2.2 BALB/c-ABCB4^{-/-}

Dieses Mausmodell [283] wurde ursprünglich als FVB/N-ABCB4^{tm1bor} vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Das MDR2/ABCB4-Gen kodiert für ein membranassoziertes Protein der Familie der ATP-binding-cassette (ABC)-Transporter, welches Phospholipide aktiv aus den Hepatozyten in die Gallengänge transportiert. Mäuse, welche homozygot für diese Mutation sind, entwickeln den Phänotyp einer sklerosierenden Cholangitis sowie eine gering ausgeprägte periportale Leberfibrose [114]. Um die Leberfibrose in diesen Knock-out Mäusen zu verstärken, wurden diese über 10 Generationen auf den genetischen Hintergrund BALB/c zurückgekreuzt [281] [280] [113]. Die Tötung dieser Mäuse erfolgte nach 8, 16, 26 sowie 52 Wochen (siehe Kap. 5.2.3).

5.2.2.3 BALB/c-ABCB4^{-/-}-Tg(ALB1HBV)

Dieses Mausmodell entstand durch die Verpaarung von Mäusen des oben beschriebenen BALB/c-ABCB4^{-/-}-Stammes mit Tieren der BALB/c-Tg(Alb1HBV)-Gruppe. Die Tötung dieser Mäuse wurde im Alter von 8, 16 und 52 Wochen vorgenommen (siehe Kap. 5.2.3).

5.2.3 Probenentnahme, -verarbeitung und -lagerung

Die Mäuse der verschiedenen Gruppen wurden im Alter von 8, 16, 26 und 52 Wochen mittels CO₂-Inhalation getötet. Anschließend wurde die Leber exentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und kurze Zeit später bei einer Temperatur von -80 °C bis zur Analyse für die vorliegende Arbeit eingefroren.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 RNA-Isolierung

Für die molekularbiologische Untersuchung benötigt man microRNA aus den Lebern der entsprechenden Mäuse. Für die vorliegende Arbeit wurde für die Isolierung von microRNA das miRNeasy mini Kit der Firma Qiagen (1) verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht im Wesentlichen auf einer Modifikation der sogenannten Single-Step Methode nach Chomczynski [284] und somit auf der Phenol-Guanidiniumthiocyanat-basierenden Lyse des entsprechenden Gewebes, der Phenol-vermittelten Lösung der RNA sowie auf der Verwendung einer Silica-Membran, welche RNA spezifisch bindet. Durch diese Methode ist es möglich, RNA ab einer Länge von ca. 18 Nukleotiden anzureichern. Da durch dieses Verfahren auch größere RNA-Moleküle extrahiert werden, erhält das abschließende Produkt die Bezeichnung total-RNA.

Die zuvor bei einer Temperatur von -80 °C (2) eingefrorenen Proben wurden auf Trockeneis (3) überführt. Anschließend wurden von jeder Einzelprobe jeweils ca. 10 mg Gewebe eingewogen (4), hierbei wurde gepoolt, was bedeutet, dass mehrere Einzelproben in einem vorher in flüssigen Stickstoff (5) gekühlten 1,5 ml Eppendorf-Tube gesammelt wurden. Die Gesamteinwaage betrug so ca. 50-60 mg Lebergewebe. Die Eppendorf-Tubes wurden bis zur weiteren Bearbeitung auf Trockeneis gelagert.

Die RNA-Isolierung wurde gemäß den Vorgaben der Firma Qiagen durchgeführt [285]. Zunächst wurde in jedes 1,5 ml Eppendorf-Tube 700 µl QIAzol Lysis Reagent gegeben, welches zur verbesserten Lyse des Gewebes führt, RNAsen inhibiert und zudem einen Großteil zellulärer DNA und Proteine mittels organischer Extraktion eliminiert. Nach diesem Schritt wurde das Gewebe mechanisch homogenisiert (6) und 140 µl Chloroform

(7) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 12000 x g sowie einer Temperatur von 4 °C (8) wurde das Homogenisat in eine obere Phase, in welcher die RNA gelöst wurde, eine mittlere Phase, welche DNA enthält und eine untere Phase mit zellulären Bestandteilen geteilt.

Die obere Phase wurde danach vorsichtig mit einer Pipette in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt, mit 1,5 Volumen 100% Ethanol (9) versetzt und sorgfältig resuspendiert. Anschließend wurden maximal 700 µl dieses Gemisches auf eine RNeasy Mini Spin-Säule gegeben und bei 10000x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur zentrifugiert (10). Der Durchfluss wurde verworfen und der vorherige Schritt mit dem restlichen Gemisch wiederholt. Daraufhin erfolgte die Überführung der Säule in ein neues Sammelröhrchen und die Zugabe von 700 µl RWT-Puffer sowie die erneute Zentrifugation. Nach diesem Schritt wurde der Durchfluss wieder verworfen und insgesamt zwei Mal mit je 500 µl RPE-Puffer die Zentrifugation wiederholt. Zuletzt wurden die Säulen bei 14000xg für eine Minute trocken zentrifugiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Die Membran wurde daraufhin mit 50 µl RNase-freiem Wasser (11) benetzt und erneut bei 10000 x g zentrifugiert. Die RNA wurde in diesem Schritt aus der Membran eluiert und befand sich somit in den Eppendorf-Tubes. Die Proben wurden anschließend bei einer Temperatur -80 °C (2) gelagert.

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus

Pipettenspitzen mit/ohne Filter

Safe Lock Tubes

Handschuhe Ansell NitraTex Größe M

- (1) Qiagen miRNeasy mini Kit
- (2) Gefrierschrank -80 °C Sanyo MDF-U6086S
- (3) Trockeneis
- (4) Feinwaage Sartorius A200S
- (5) Flüssigstickstoff sowie Stickstofftank Linde CRYO SPEED MED
- (6) Homogenisator IKA Ultra-Turrax T8
- (7) Chloroform mind. 37%
- (8) Zentrifuge Hettich Mikro 200R
- (9) Ethanol abs.
- (10) Zentrifuge Hettich Mikro 120
- (11) RNase-freies Wasser

5.3.2 Bestimmung des RNA-Gehalts mittels Spektrophotometer

Zur Quantifizierung des RNA-Gehalts der einzelnen Proben wurde die optische Dichte einer 1 mm und einer 0,2 mm langen Probensäule bei einer Wellenlänge von 280 nm,

260 nm sowie bei 230 nm mit einem Spektrophotometer (1) erfasst. RNA sowie DNA absorbieren aufgrund der enthaltenen Nukleinsäuren ultraviolettes Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Proteine hingegen haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, Kontaminanten wie beispielsweise Phenol absorbieren bei einer Wellenlänge von 230 nm. Nachdem die Absorption eines Leerwertes mit dH₂O gemessen wurde, erfolgte die Messung der Proben.

Aus den erhobenen Messwerten wurden daraufhin folgende Quotienten gebildet:

$A_{260/280}$:

Das Verhältnis der optischen Dichten bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm gibt Aufschluss über die Reinheit der RNA respektive der DNA. Ab einem Wert von 2,0 kann man von einer reinen RNA ausgehen. Niedrigere Werte dieses Quotienten sind ein Hinweis auf Verunreinigungen der Proben [286, 287].

$A_{260/230}$:

Wie der obige Quotient ist auch das Verhältnis der optischen Dichte bei Wellenlängen von 260 nm und 230 nm ein Indikator für die Reinheit der gewonnen RNA und befindet sich bei unkontaminierten Proben im Bereich 1,8-2,2 [286, 287].

Die RNA-Konzentration in den Proben wurde daraufhin mithilfe der modifizierten Lambert-Beer-Formel (siehe Formel 1) ermittelt.

$$C_{RNA} = (A_{260} - A_{LW}) \cdot 40 \cdot V$$

C_{RNA} = RNA-Konzentration (ng/μl)

A_{260} = Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm

A_{LW} = Absorption der Leerwertprobe bei einer Wellenlänge von 260 nm

40 = RNA-spezifischer Multiplikationsfaktor

V = Verdünnungsfaktor

Formel1: Modifizierte Lambert-Beer-Formel zur Bestimmung der RNA-Konzentration.

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus

Pipettenspitzen mit/ohne Filter

Safe Lock Tubes

Handschuhe Ansell NitraTex Größe M

(1) NanoDrop 1000 Spektrophotometer

5.3.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Durch diese Methode wird eine Qualitätskontrolle der zuvor isolierten RNA ermöglicht. Das Verfahren der Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit, Nukleinsäurefragmente durch Anlage eines elektrischen Feldes nach Masse und Konformation aufzutrennen. Aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste wandern Nukleinsäuren in Richtung der positiv geladenen Anode und werden durch die Polymeranteile des Agarose-Gels, die ein engmaschiges dreidimensionales Netz bilden, in ihrer Migration beeinflusst. Große Moleküle bewegen sich daher im Verhältnis zu kleinen langsamer, es erfolgt eine Auftrennung. Um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern, erfolgt die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Aus diesem Grund wird Formaldehyd zugegeben, welches an die Aminosäuren Adenin, Guanosin und Cytosin unter der Bildung Schiff'scher Basen bindet und somit die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhindert [288].

Da die zuvor isolierte total-RNA zu 80% aus ribosomaler RNA besteht [289], erfolgt mit dieser Methode bei erhaltener Integrität der Nachweis der 18S- bzw. 28S-Untereinheit der rRNA.

Das Agarose-Gel wurde jeweils ca. eine Stunde vor der Gelelektrophorese angefertigt. Hierzu wurden Agarose-Pulver, 10-fach konzentrierter MOPS-Puffer [290] und dH₂O in einem Becherglas zusammengegeben und in einer Mikrowelle (1) insgesamt drei Mal aufgekocht. Anschließend kühlte das Gemisch unter einem Abzug auf eine Temperatur von 60 °C ab. Daraufhin wurde Formaldehyd (12) hinzugegeben, das Gel in vorbereitete RNA-freie Formen gegossen und die vollständige Polymerisierung abgewartet.

Je 1 µl Probenmaterial wurde zunächst in 0,5 ml Eppendorf-Tubes mit 4 µl Ethidiumbromid-haltigem Ladepuffer versetzt. Ethidiumbromid ist ein roter Phenantridin-Farbstoff, welcher an Nukleinsäuren bindet, dadurch eine Änderung des Absorptionsspektrums erfährt [291–293] und unter ultraviolettem Licht fluoresziert. Aus diesem Grund fluoreszieren in einer Gelelektrophorese die Bereiche, in welchen sich RNA-Moleküle befinden. Das Gemisch wurde anschließend in einem Thermomixer (2) bei einer Temperatur von 65 °C für 10min denaturiert und anschließend auf Eis (3) gelagert. Die Elektrophorese-Kammer (5) wurde mit 1x MOPS-Puffer gefüllt und nach kurzer Zentrifugation erfolgte die Beladung der Geltaschen mit je 4 µl des Probengemischs. Anschließend wurde die Kammer für 60 Minuten bei einem Stromfluss von 65 V (6) betrieben. Danach wurde das Gel in eine Fotokammer (7) überführt, die Banden der 18S- sowie 28S-Untereinheit unter ultraviolettem Licht begutachtet, fotografiert (8) und elektronisch gespeichert (9) (siehe Abbildung 10). Die für diese Methode verwendeten Puffer und Lösungen, Geräte sowie Materialien sind nachfolgend aufgeführt.

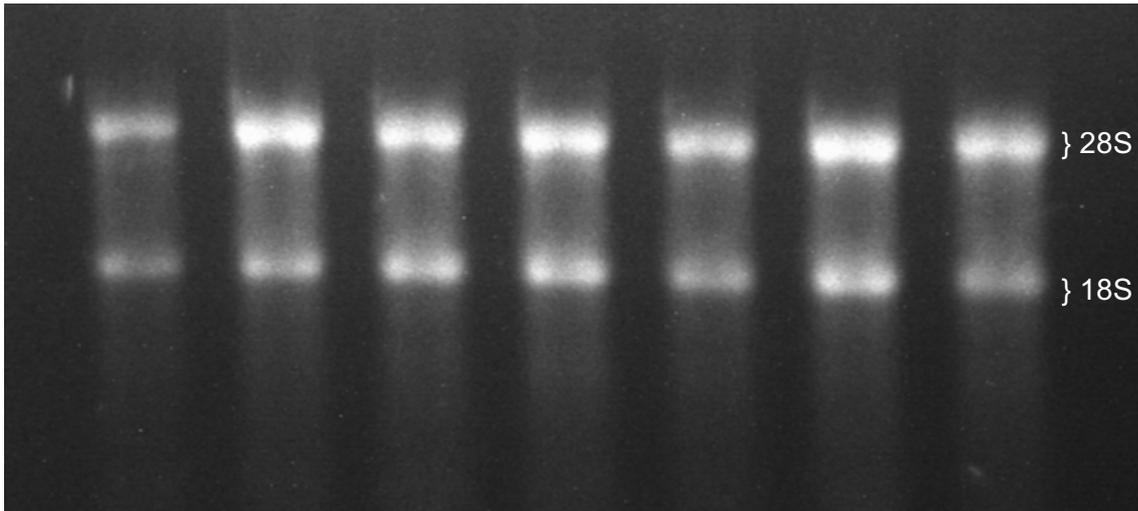


Abbildung 10: Beispiel einer Agarose-Gelelektrophorese.
Deutlich erkennbar sind die Banden der 28S- sowie 18S-Untereinheit.

Tabelle 14 - verwendete Lösungen und Puffer RNA-Gelelektrophorese

Bezeichnung	Ansatz
1,5%iges Agarose-Gel	2,25 g Agarose-Pulver (10) 123,75 ml dH ₂ O (11) 15 ml 10-fach konzentrierter MOPS-Puffer Zugabe von 11,25 ml Formaldehyd (11)
MOPS-Puffer (10-fach konzentriert)	41,8 g MOPS (13) 6,8 g Natriumacetat (14) ad 1000 ml DEPC-Wasser pH=7,0
DEPC-Wasser	1 ml DEPC (15) ad 1000 ml dH ₂ O 12 h bei 37 °C inkubieren (16) 15 min autoklavieren (17)
RNA-Ladepuffer	NorthernMax Formaldehyde Load Dye (18) 50 µl Ethidiumbromidlösung 1% (19)

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus

Pipettenspitzen mit/ohne Filter

Safe Lock Tubes

Handschuhe Ansell NitraTex Größe M

- (1) Mikrowelle Severin 900 & Grill
- (2) Thermomixer Eppendorf Thermomixer comfort
- (3) Eismaschine
- (4) Zentrifuge Hettich Mikro 120
- (5) Elektrophoresekammer HU6 Mini Horizontal
- (6) Elektrophoresis Power Supply Consort EV243
- (7) Geldokumentationssystem Camag ReproStar 3
- (8) USB-Kamera Phytex AK 901 mono 5mpix
- (9) USB-Kamera-Software Phytex Vision Demo v2.2
- (10) Agarose Broad Range Pulver
- (11) RNase-freies Wasser
- (12) Formaldehyd min. 37%
- (13) 3-Morpholinopropansulfonsäure 99,5% (MOPS)
- (14) Natriumacetat - Sodium acetate trihydrate
- (15) Diethylpolycarbonat (DEPC)
- (16) Brutschrank Jouan IG 150
- (17) Autoklav 755 H+P Varioklav
- (18) NorthernMax Formaldehyde Load Dye
- (19) Ethidiumbromidlösung 1%

5.3.4 Transkription von microRNA zu cDNA

Um die isolierte RNA im Rahmen einer Polymerase-Ketten-Reaktion analysieren zu können, muss zunächst die Umschreibung in eine sogenannte complementary DNA (cDNA) erfolgen. Dieser Schritt ist notwendig, da die später in der PCR verwendete Polymerase keine RNA als native Vorlage verwenden kann. Aus diesem Grund kommen reverse Transkriptasen zum Einsatz, welche aus einem RNA-Einzelstrang durch ihre RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang generieren. Anschließend erfolgt der Abbau des RNA-Teils durch die Ribonuklease-Aktivität sowie die Komplementierung des verbleibenden DNA-Stranges durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität. Um überhaupt mit der Transkription von microRNA zu cDNA beginnen zu können, benötigt die Polymerase eine Hydroxy-Gruppe als Startpunkt. Diese wird von Oligonukleotiden, auch Primer genannt, zur Verfügung gestellt. Diese Primer weisen eine bestimmte Sequenz auf und lagern sich an komplementäre RNA-Sequenzen. Somit ist es möglich, spezifische Sequenzen selektiv zu transkribieren und letztendlich auch zu amplifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze zur Analyse der microRNA verwendet, welche auf unterschiedlichen Verfahren der qRT-PCR basieren und damit auch mit verschiedenen Anforderungen an die davor geschaltete reverse Transkription einhergingen.

Zunächst wurde cDNA für die Analyse mittels dem miFinder PCR-Array der Firma Qiagen benötigt, welcher auf der Verwendung von SYBR-Green-Reagenzien basiert. Für die Validierung der in diesem Array erhobenen Daten wurden TaqMan-Assays verwendet, welche - wie der Name impliziert - auf der Verwendung spezifischer TaqMan-Sonden beruht.

Die beiden Verfahren vorangehende reverse Transkription ist jeweils spezifisch für die verwendete PCR-Methode. Das zuvor gewonnene Ausgangsmaterial, die total RNA, (siehe 5.3.1) ist jedoch identisch. Da microRNA lediglich eine Länge von ca. 20 Nukleotiden aufweisen und damit zu kurz sind, um mit konventionellen Primern in der PCR eine spezifische Amplifikation zu ermöglichen, bedarf es einer Modifikation dieses Verfahrens.

5.3.4.1 Reverse Transkription unter Verwendung des miScript II RT Kit

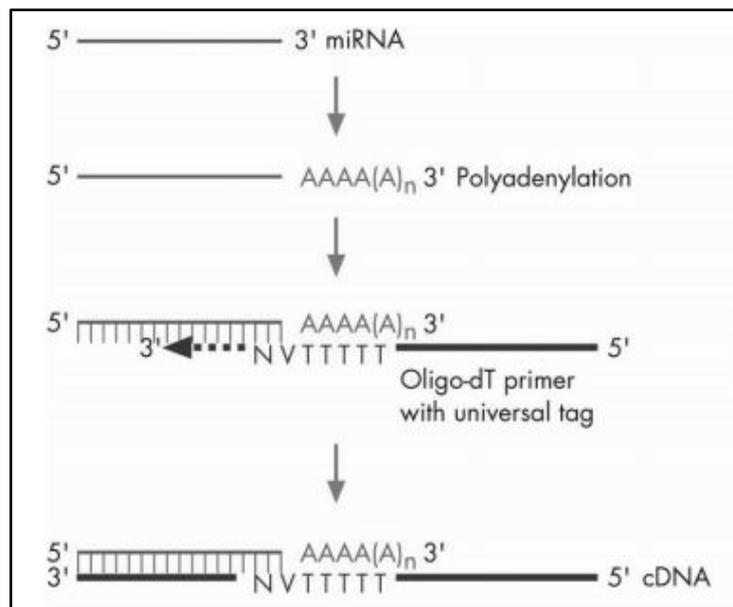


Abbildung 11: Schema der reversen Transkription unter Verwendung des miScript II RT Kit (modifiziert nach [21]).

Bei der Variante der reversen Transkription mit dem miScript II RT Kit von Qiagen (1) erfolgt zunächst eine universelle Transkription, was bedeutet, dass jegliche microRNA-Sequenz revers transkribiert wird. Dafür wird zunächst an jedes microRNA-Molekül, wel-

che im Gegensatz zu mRNA nativ nicht polyadenyliert sind, eine Poly-A-Sequenz angefügt. An diese Sequenz hybridisiert im nächsten Schritt ein Oligo-dT-Primer und vermittelt dadurch die cDNA-Synthese durch eine Polymerase (siehe Abbildung 11).

Zunächst wurde der Ansatz entsprechend dem Protokoll [294] des Herstellers angefertigt (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15 - Ansatz reverse Transkription (miScript II RT Kit)

Bezeichnung	Volumen (1x Ansatz)
5x miScript HiSpec Buffer	4,00 µl
10x miScript Nucleics Mix	2,00 µl
miScript reverse Transcriptase Mix	2,00 µl
RNAse free water (2)	variabel
template RNA	variabel
Gesamtvolumen	20,00 µl

Die verschiedenen Reagenzien wurden zunächst in 0,5 ml Eppendorf-Tubes pipettiert. Da laut Protokoll [294] der RNA-Gehalt 500 ng pro Ansatz betragen sollte, wurden unterschiedliche Volumina der total RNA hinzugefügt und anschließend mit dH₂O auf das Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl aufgefüllt. Nach sorgfältigem Verschließen der Tubes und kurzer Zentrifugation wurden diese in einen Thermocycler (3) platziert und die PCR mit folgenden Parametern gestartet (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16 - Temperaturprofil reverse Transkription (miScript II RT Kit)

Temperatur	Zeit
37°C	60min
95°C	5min

Nach Beendigung der PCR wurde gemäß dem Protokoll in jedes Eppendorf-Tube 90 µl dH₂O hinzugefügt und die Proben bei einer Temperatur von -20 °C (4) gelagert.

5.3.4.2 Reverse Transkription unter Verwendung des TaqMan-Assays

Im Gegensatz zur vorher beschriebenen Methode basiert das Funktionsprinzip der reversen Transkription mit dem TaqMan-Assay RT Kit von Life Technologies (5) nicht auf der Polyadenylierung, sondern auf sogenannten Stem-loop-Primern, welche mit wenigen Nukleotiden an ihrem 5'-Ende spezifisch an das 3'-Ende der entsprechenden microRNA hybridisieren (Abbildung 12). Der Vorteil der Konformation dieser Primer liegt in einer höheren thermalen Stabilität [295] sowie einer höheren Effizienz [273] im Vergleich zu linearen Primern.

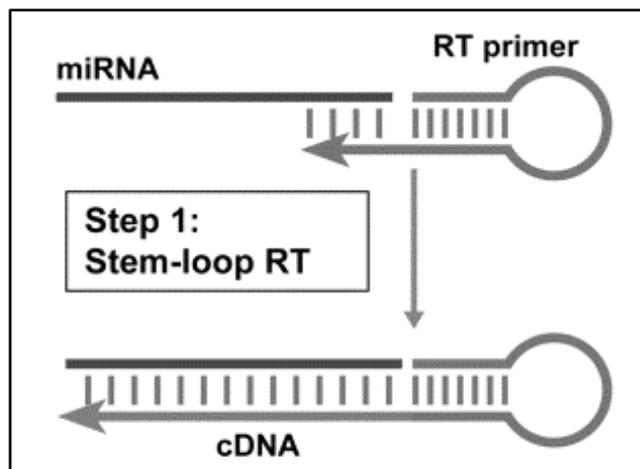


Abbildung 12: Schematische Darstellung der reversen Transkription mit Stem-loop Primern (modifiziert nach [273]).

Zunächst erfolgt die spezifische Hybridisierung des Stem-loop-Primers an das 3'-Ende der microRNA, ausgehend von diesem Primer beginnt die cDNA-Synthese.

Für die Umschreibung von microRNA zu cDNA wurde zunächst ein Primer-Pool [296] vorbereitet, die verwendeten TaqMan-Assays sowie die dazugehörigen IDs sind in Tabelle 12 aufgeführt. Für den Primer-Pool wurden jeweils 10 µl 5x-Primer in ein 1,5 ml-Eppendorf-Tube zusammengeführt, anschließend mit TE-Puffer (5) auf 1000 µl aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Bei einer Gesamtzahl von 13 Primern ergab sich gemäß Tabelle 17 folgende Zusammensetzung.

Tabelle 17 - Ansatz Primer-Pool

Bezeichnung	Volumen
5x-Primer (je 10µl)	130 µl
TE-Puffer	870 µl
Gesamtvolumen	1000 µl

Gemäß dem Protokoll [296] ist es möglich, einen RNA-Gehalt von bis zu 350 ng pro Ansatz zu verwenden. Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration in den einzelnen Proben (vgl. 5.3.2) wurde jeweils das benötigte Volumen berechnet, welches eine RNA-Konzentration von 350 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl ermöglichte. Auf das Zielvolumen wurde mit dH₂O aufgefüllt.

Jeder Versuchsansatz wurde entsprechend Tabelle 18 angefertigt.

Tabelle 18 - Ansatz reverse Transkription (Primer-Pool, TaqMan RT Kit)

Bezeichnung	Volumen
reverse transcription primer pool	6,00 µl
dNTPs with dTTP (100mM)	0,30 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl)	3,00 µl
10x RT Buffer	1,50 µl
RNase Inhibitor (20U/µl)	0,19 µl
total RNA (350ng/µl)	1,00 µl
Nuclease-free water	3,01 µl
Gesamtvolumen	15,0 µl

Jeder Ansatz wurde in einem 0,5 ml Eppendorf-Tube vermischt, fest verschlossen, anschließend geschwenkt, kurz zentrifugiert und in einem Thermocycler (3) wie in Tabelle 19 inkubiert.

Tabelle 19 - Temperaturprofil reverse Transkription (TaqMan RT Kit)

16°C	30 Minuten
42°C	30 Minuten
85°C	5 Minuten

Die Temperaturabfolge ermöglicht die Reaktion: Bei einer Temperatur von 16 °C hybridieren die Primer an die RNA-Matrize. Bei der anschließenden Temperatur von 42 °C erreicht die verwendete Polymerase ihr Wirkmaximum und die RNA wird in cDNA

transkribiert. Die kurzzeitige Temperaturerhöhung auf 85 °C bewirkt die Denaturierung der Polymerase. Das Endprodukt (cDNA) kann nun für weitere Analysen verwendet werden. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben bei -20 °C (4) eingefroren und bis zur weiteren Analyse gelagert.

Die Puffer, Materialien und Geräte, welche für die reverse Transkription verwendet wurden, sind nachfolgend aufgeführt.

Tabelle 20 - Puffer für die reverse Transkription

Bezeichnung	Ansatz
TE-Puffer	1 ml 1M Tris-CL 200 µl EDTA, 0,5M ad 100 ml dH ₂ O

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus

Pipettenspitzen mit/ohne Filter

Safe Lock Tubes

Handschuhe Ansell NitraTex Größe M

- (1) miScript II RT Kit
- (2) RNase-freies Wasser
- (3) Thermomixer Eppendorf Thermomixer comfort
- (4) Gefrierschrank Liebherr GN 2856
- (5) TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit
- (6) Pufferan Tris
- (7) EDTA, 0,5M

5.3.5 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

5.3.5.1 Prinzip der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Das Verfahren der quantitativen real-time PCR [297] stellt eine Kombination aus der konventionellen PCR und einer quantitativen Analyse der Produkte dar und ist eine gängige Methode zur selektiven Amplifizierung und Analyse spezifischer DNA-Abschnitte. Benötigt werden hierzu zunächst Oligonukleotide (Primer, [298]) mit der komplementären Sequenz der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, Desoxyribonukleotide zur Polymerisation des Komplementärstranges, eine Polymerase, welche die Reaktion katalysiert sowie Puffer, die ein entsprechendes chemisches Milieu herstellen. Die Reaktion verläuft repetitiv prinzipiell in drei Schritten:

(1) Denaturierung:

Bei hohen Temperaturen (ca. 95 °C) werden zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die Einzelstränge der DNA verbinden, aufgespalten, sodass anschließend lediglich DNA-Einzelstränge als sogenannte Matrize vorliegen. Dieser Zustand ist Voraussetzung für den zweiten Schritt der Reaktion.

(2) Primerhybridisierung:

In Abhängigkeit von der Länge und Sequenz des Primers erfolgt in diesem Schritt die komplementäre Anlagerung des Primers an die DNA-Einzelstränge bei einer Temperatur von ca. 65 °C.

(3) Elongation:

Die freie OH-Gruppe am 5'-Ende des Primers dient als Startpunkt für eine Polymerase, welche den Komplementärstrang entlang der Matrize in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Aufgrund der Temperaturverhältnisse während einer PCR wird die thermostabile Taq-Polymerase verwendet, welche ein Wirkmaximum bei 60-72°C besitzt. [299, 300] Die Geschwindigkeit dieses Schrittes ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts, der verwendeten Polymerase sowie der Verfügbarkeit von Substraten. Unter idealen Bedingungen wird während jedem Elongationsschritt der DNA-Gehalt der Probe verdoppelt, was einer exponentiellen Amplifikation entspricht.

Nach diesem Schritt erfolgt die erneute Denaturierung der DNA, sodass Matrize, Syntheseprodukt sowie die Primer wieder getrennt werden und der Zyklus erneut beginnen kann.

Die Quantifizierung der DNA erfolgt mit unterschiedlichen Methoden, welche jeweils in den nachfolgenden Abschnitten erläutert werden.

5.3.5.2 Funktionsprinzip der qRT-PCR unter Verwendung von SYBR-Green

Wie zuvor erläutert (siehe 5.3.4), basiert der miFinder PCR-Array auf der Verwendung von SYBR-Green-Reagenzien [294]. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet [301]. Der dabei entstehende DNA-Fluoreszenzfarbstoffkomplex absorbiert blaues Licht ($\lambda_{\text{max}}=494$ nm) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\text{max}}=521$ nm). Die Fluoreszenz, welche in Echtzeit detektiert wird, ist proportional zur Menge der PCR-Produkte. Aus diesem Grund ist es möglich, Aussagen über das quantitative Vorliegen amplifizierter DNA-Abschnitte in der gemessenen Probe zu tätigen.

5.3.5.3 Funktionsprinzip der qRT-PCR unter Verwendung von TaqMan-Sonden

Die Quantifizierung wird mithilfe von TaqMan-Sonden realisiert. Dieses Verfahren beruht auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase sowie der Verwendung von Oligonukleotiden, deren 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat, FAM) versehen ist, während das 3'-Ende einen Quencher (Rhodamin-Derivat, MGB-NFQ) trägt. Erfolgt bei intakter Sonde die Anregung bei einer spezifischen Wellenlänge, inhibiert der Quencher aufgrund der Nähe zum Reporter dessen Fluoreszenz im Rahmen eines Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET) [302]. Während der PCR hybridisieren diese Oligonukleotide ebenfalls an die DNA-Einzelstränge und werden in der Elongationsphase durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase geschnitten, die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher wird damit aufgehoben und der FRET unterbrochen. Das Ergebnis dieser Prozessierung ist eine messbare Fluoreszenz, welche proportional zur Menge des PCR-Produktes ist und in Echtzeit detektiert werden kann. Die Assay-ID der verwendeten TaqMan-Assays sind in Tabelle 12 aufgeführt.

5.3.5.4 Versuchsansatz qRT-PCR – Qiagen miFinder PCR-Array

Zunächst wurden der 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (1), der 10x miScript Universal Primer sowie die cDNA (siehe 5.3.4.1) bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Ansatz für den Qiagen Mouse miFinder PCR-Array (2) wurde gemäß dem Protokoll [294] in einem 15 ml-Falcon-Tube (3) angefertigt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20 - Ansatz qRT-PCR - miFinder PCR-Array

Bezeichnung	Volumen
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375 µl
10x miScript Universal Primer	275 µl
template cDNA	25 µl
RNAse-freies Wasser (4)	1075 µl
Gesamtvolumen	2750 µl

Nach Verschluss des Reagenzgefäßes wurde dieses mehrmals geschwenkt sowie kurz anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Überführung von 25 µl des Gemisches in jeden Einsatz der zuvor aufgetauten 96-well-PCR-Platte mithilfe einer Multipipette (5) mit 5 ml-Dispensier-Einsatz (6). Das Layout der 96-well-PCR-Platte ist in Abbildung 13 dargestellt. Die präparierte PCR-Platte wurde danach mit Parafilm (7) versiegelt und bei

Raumtemperatur mit 1000 x g für eine Minute zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Beladung des RT-PCR-Instruments (8) (9). Die für diese Methode verwendeten Geräte, Chemikalien sowie Materialien sind nachfolgend aufgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	Ce	Ce	SN1	SN2	SN3	SN4	SN5	SN6	miRNC	miRNC	PPC	PPC

Abbildung 13: Layout der 96-well-PCR-Platte des miFinder PCR-Array.

Well A1 bis G84 enthalten je einen spezifischen miScript Primer Assay, die Wells H1 und H2 enthalten C. elegans miR-39 miScript Primer Assays, welche als alternativer interner Standard verwendet werden können. Die Wells H3 bis H8 enthalten interne Standards, welche zur Normalisierung der Array-Daten dienen (SN1 = SNORD61 assay, SN2 = SNORD68 assay, SN3 = SNORD72 assay, SN4 = SNORD95 assay, SN5 = SNORD96A assay, SN6 = RNU6B/RNU6-2 assay). Die übrigen vier Wells H9 bis H12 dienen als Positiv-Kontrolle für die reverse Transkription sowie die PCR (modifiziert nach [294]).

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus

Pipettenspitzen mit/ohne Filter

Safe Lock Tubes

Handschuhe Ansell NitraTex Größe M

- (1) 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- (2) Qiagen Mouse miFinder microRNA PCR-Array MIMM-001Z
- (3) Reaktionsgefäße Falcon, 15ml, 50ml
- (4) RNase-freies Wasser
- (5) Pipette Eppendorf Multipette plus
- (6) Pipettenspitzen Multipette Ritips professional 0,5ml
- (7) Parafilm „M“
- (8) Real-Time-PCR-System Applied Biosystems StepOnePlus
- (9) Real-Time-PCR-System-Software AB StepOne Software 2.2

5.3.5.5 Ansatz qRT-PCT - TaqMan-Assay

Zunächst wurden die Reagenzien auf Eis aufgetaut und der PCR-Ansatz gemäß dem Protokoll des Herstellers [296] präpariert (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21 - Ansatz qRT-PCR - TaqMan-Assay

Bezeichnung	Volumen
20x TaqMan microRNA Assay	1,00 µl
Produkt der reversen Transkription	0,16 µl
TaqMan Universal Maser Mix II	10,00 µl
Nuclease-free water	8,84 µl
Gesamtvolumen	20,00 µl

Um Ungenauigkeiten beim Pipettiervorgang zu kompensieren, erfolgte die Messung eines jeden Ansatzes in Triplikaten, deren Mittelwerte zur weiteren Analyse verwendet wurden. Darüber hinaus wurde für jeden einzelnen TaqMan-Assay die Bestimmung einer Negativkontrolle als Duplikat durchgeführt. In diesen Ansätzen wurde anstelle des Produktes der reversen Transkription lediglich RNase-freies Wasser (1) verwendet. Zunächst wurde in PCR-Reaktionsgefäßen jeweils 10 µl TaqMan Universal Master Mix II (2) sowie 8,84 µl RNase-freies Wasser und 1,00 µl des jeweiligen 20x-TaqMan-microRNA-Assays vermischt. Im darauffolgenden Schritt wurde in jedes PCR-Reaktionsgefäß (3) 0,16 µl des Produktes der reversen Transkription respektive RNase-freies Wasser (Negativkontrolle) pipettiert. Das Reaktionsvolumen betrug so pro Ansatz jeweils 20,00 µl.

Die PCR-Reaktionsgefäße wurden mithilfe eines Capping Tools (4) (5) fest verschlossen, kurz zentrifugiert (6) und bis zum Beladen des Real-Time-PCR-Instruments (7) (8) auf Eis gelagert. Die für diese Methode verwendeten Geräte, Chemikalien sowie Materialien sind nachfolgend aufgeführt.

Verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten Eppendorf Typ Research / Research plus
- Pipettenspitzen mit/ohne Filter
- Safe Lock Tubes
- Handschuhe Ansell NitraTex Größe M
- (1) RNase-freies Wasser

- (2) TaqMan Universal Master Mix II, no UNG
- (3) MicroAmp Fast Reaction Tubes
- (4) MicroAmp Optical 8-cap strip
- (5) PCR-Tube Capping Tool
- (6) Zentrifuge Roth Rotilabo Mini
- (7) Real-Time-PCR-System Applied Biosystems StepOnePlus
- (8) Real-Time-PCR-System-Software AB StepOne Software 2.2

5.3.6 qRT-PCR-Messung

Die Messung der präparierten Proben erfolgte mit dem Real-Time-PCR-System StepOnePlus und der damit verbundenen StepOne Software v2.2.2 der Firma Applied Biosystems.

Während der PCR wurde der sogenannte Ct-Wert jeder einzelnen Probe ermittelt. Ct ist eine Abkürzung für den englischen Begriff cycle threshold und beschreibt im Rahmen der DNA-Quantifizierung mittels real-time-PCR den Punkt, an dem die gemessene Fluoreszenzkurve einer Probe erstmalig exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Dieser Wert wird durch den initialen DNA-Gehalt der Probe maßgeblich beeinflusst. Ein Vergleich von Ct-Werten unterschiedlicher Proben erlaubt Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt vor der Amplifikation, durch die zusätzliche Normierung der einzelnen Ct-Werte auf die Ct-Werte der internen Kontrolle (z.B. snoRNA202) mittels der $\Delta\Delta$ -Ct-Methode [303] lässt sich zudem eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander herstellen. Die exakten Parameter für die jeweiligen PCRs sind untenstehend angegeben (siehe 5.3.6.1 sowie 5.3.6.2).

5.3.6.1 qRT-PCR-Messung - miFinder PCR-Array

Das Temperaturprofil wurde wie in dem entsprechenden Protokoll [294] angegeben programmiert (siehe Abbildung 14).

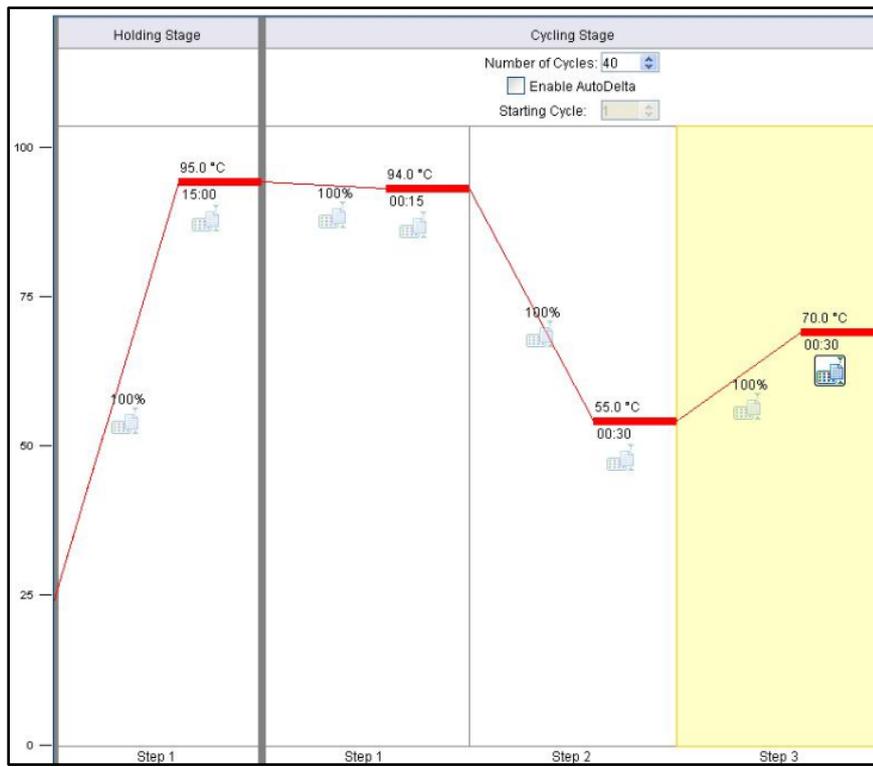


Abbildung 14: Temperaturprofil der qRT-PCR – Qiagen miFinder PCR-Array (Screenshot).

Zunächst erfolgte in einem initialen Schritt die Aktivierung der Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 95°C. Anschließend erfolgten 40 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C, Annealing bei 55°C sowie Elongation bei 70°C.

5.3.6.2 qRT-PCR-Messung – TaqMan-Assay

Für die PCR mit TaqMan-Assay wurde das in Abbildung 15 gezeigte Temperaturprofil nach den Angaben im Protokoll [296] eingestellt.

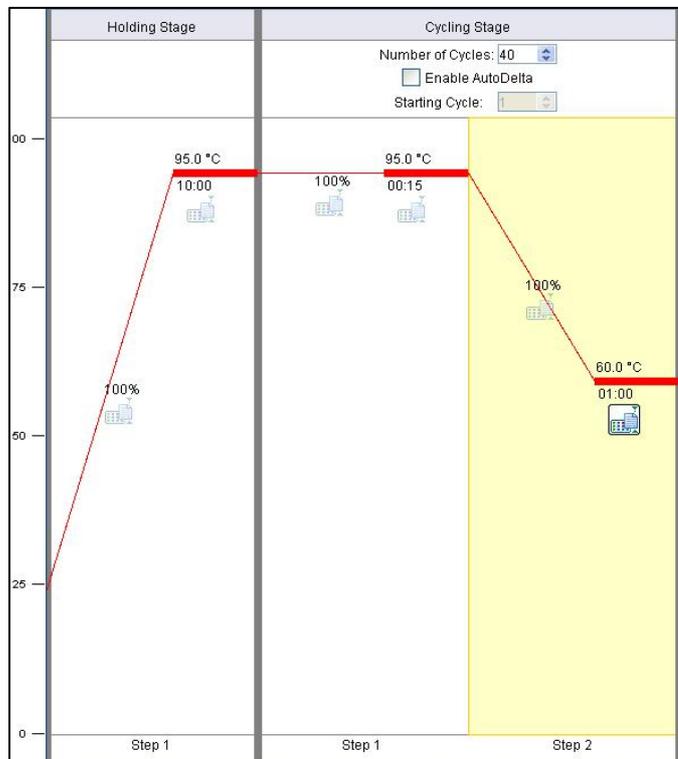


Abbildung 15: Temperaturprofil der qRT-PCR - TaqMan (Screenshot).

Die Aktivierung der Taq-Polymerase erfolgte bei dieser Methode ebenfalls bei 95°C, anschließend erfolgten 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C sowie Annealing und Elongation bei 60°C.

Als interne Kontrolle wurde snoRNA-202 verwendet. Diese nicht-kodierende small nucleolar RNA [304] wird in verschiedenen Mausgeweben konstitutiv exprimiert, nicht von äußeren Einflüssen reguliert und eignet sich daher als interne Kontrolle [305].

5.3.7 MicroRNA-micro-Array

Micro-Array-Analysen erlauben die parallele Analyse der differentiellen Expression einer Vielzahl von microRNA mittels sogenannter spotted arrays. Bei dieser Form des Mikroarrays werden Oligonukleotidsonden bekannter Sequenz maschinell auf einen Chip aufgetragen. Anschließend erfolgt die Beladung dieses Chips mit aufbereitetem Probenmaterial, in welchem die verschiedenen microRNA vorher zunächst polyadenyliert und mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Oligonukleotiden mit dem Farbstoff Cy5 markiert wurden. Im nächsten Schritt hybridisieren die markierten microRNA-Sequenzen mit den auf dem Chip befindlichen Sonden. Nach mehreren Waschvorgängen wird jede Position des

Chips mit einem Laser abgetastet und dabei die Intensität der Fluoreszenz, welche proportional zur Menge der hybridisierten microRNA ist, erfasst. Aufgrund der Intensitätsunterschiede lassen sich Rückschlüsse auf Unterschiede in der microRNA-Expression in unterschiedlichen Proben ziehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde diese Analyse von einem externen Dienstleister durchgeführt (LC Sciences, Houston, Texas, USA, www.lc-sciences.com) und eröffnete die Möglichkeit, jegliche bekannte reife microRNA der Maus (Stand: Sanger miR-Base Release v21, Juni 2014: 1900 reife microRNA) zu analysieren.

Eine vollständige Auflistung der erfassten microRNA kann online unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GPL20871> werden.

Ein Beispiel eines Chips ist nachfolgend abgebildet (Abbildung 16). Zu beachten ist, dass für die visuelle Darstellung der Signalintensität farbliche Abstufungen gewählt werden. Blau entspricht der Signalwert 1 der Farbe Blau und bildet das untere Ende der Intensitätsskala, auf der anderen Seite entspricht Rot dem Signalwert 65.535 und damit einer hohen Intensität.

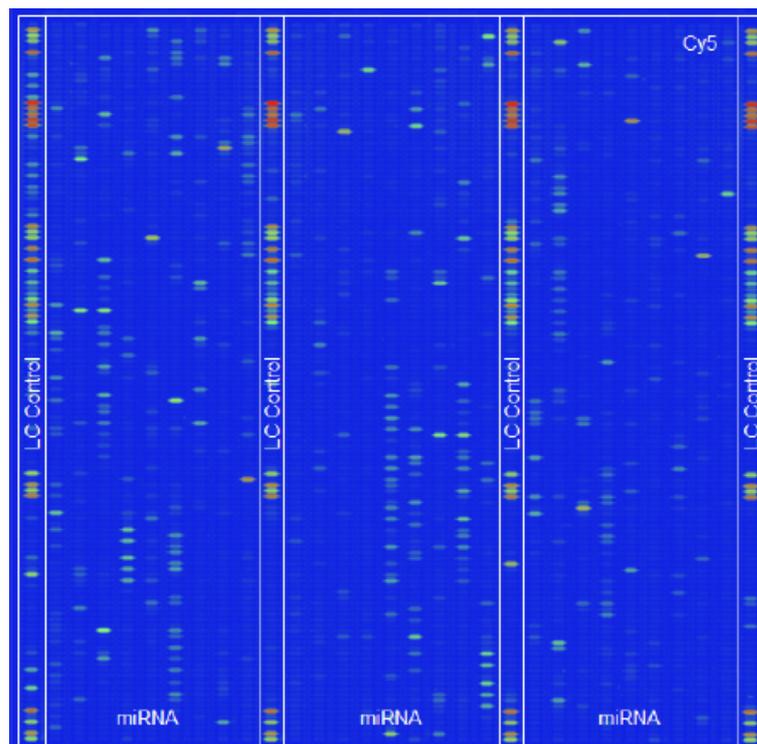


Abbildung 16: Beispiel eines micro-Array-Chips.

Unterteilung in insgesamt sechs Spalten, wovon die Hälfte für interne Kontrollen genutzt wird (schmale Spalten) und die andere Hälfte das Probenmaterial enthält (breite Spalten). Unterschiedliche Signalintensitäten sind farblich kodiert dargestellt. Blau entspricht einer geringen, Rot hingegen einer hohen Signalintensität

5.3.7.1 Probenpräparation für den microRNA micro-Array

Für die Analyse wurde total-RNA verwendet. Diese wurde mit dem miRNeasy Kit von Qiagen (siehe Kapitel 5.3.1) isoliert, die Konzentration mittels Spektrophotometer erfasst (siehe Kapitel 5.3.2) und die Qualität mit einer RNA-Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 5.3.3) überprüft. Der Versand der Proben erfolgte auf Trockeneis.

5.4 Datenbearbeitung und Auswertung

5.4.1 Messergebnisse des Mouse miFinder PCR-Array

Die erhobenen Messergebnisse des Mouse miFinder PCR-Array von Qiagen wurden mit Hilfe eines web-basierten Portals analysiert [306]. Hierzu wurden die zuvor erhobenen CT-Werte im .xls-Format in eine entsprechende Online-Eingabemaske eingegeben. Die Software berechnete daraufhin die Änderungen der unterschiedlichen microRNA auf Basis der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode für die relative Quantifizierung [307].

5.4.2 Messergebnisse der qRT-PCR mit TaqMan-Assays

Zunächst erfolgte auch bei dieser Auswertung die Berechnung der relativen Änderung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode [307].

Die finale statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung der in der qRT-PCR mittels TaqMan-Assays erhobenen Daten erfolgte mittels der Software Microsoft Excel. Die Stichprobenanzahl der erfassten Messungen betrug $N = 4-5$. Die Ergebnisse wurden als fold-change, also als x-fache Änderung dargestellt. Dieser Wert ist größer 1, wenn ein spezifisches Gen in einer bestimmten Gruppe (z.B. Fallgruppe) im Vergleich zu einer anderen Kohorte (z.B. Wildtyp) vermehrt transkribiert wird. Im Umkehrschluss bedeutet ein Wert zwischen 0 und 1, dass ein Gen vermindert transkribiert wird.

5.4.3 Messergebnisse des micro-Array

Wie bereits in Abschnitt 5.3.7 beschrieben, wurde die Signalintensität jeder Position sowie das Hintergrundrauschen des micro-Array Chips zunächst mit einem Laser erfasst. Die letztendlich dargestellten Messwerte entsprechen der Differenz aus Signalintensität einer spezifischen Position auf dem Chip abzüglich des Hintergrundrauschens. Während der Auswertung wurden Messwerte einer Position mit mehr als 50% Abweichung von dem Mittelwert bzw. einem Variationskoeffizienten $>0,5$ verworfen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J, Würger T, Schröder D, Matono T, Mollenkopf H-J, Montalbano R, Pompaiah M, Reifenberg K, Zahner D, Ocker M, Gerlich W, Glebe D, Roeb E. Pathological impact of hepatitis B virus surface proteins on the liver is associated with the host genetic background. *PLoS ONE*, 2014
- 2 Würger T, Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Verstärkte hepatische Expression neuer MicroRNA bei ABCB4^{-/-} Mäusen im Langzeitmodell. *Z Gastroenterol*, 2015
- 3 Würger T, Churin Y, Roderfeld M, Stiefel J., Reifenberg K., Mollenkopf H-J., Schröder D., Montalbano R., Ocker M., Glebe D., Roeb E. Direkte proapoptotische und onkogene Effekte des Hepatitis B-Oberflächenproteins in der Leber HBV-transgener Mäuse. *Gastroenterologie*, 2013
- 4 Churin Y, Würger T, Roderfeld M, Stiefel J, Reifenberg K, Mollenkopf HJ, Schröder D, Montalbano R, Ocker M, Glebe D, Roeb E. Direkte zytotoxische Effekte des Hepatitis B Virus Oberflächenproteins in der Leber. *Z Gastroenterol*, 2013
- 5 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004
- 6 Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2012
- 7 Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.*, 2010
- 8 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 2004
- 9 He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 2004
- 10 Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*, 2009
- 11 Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*, 2005
- 12 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005
- 13 Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, 2006
- 14 Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 2003

- 15 Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004
- 16 Cuellar TL, McManus MT. MicroRNAs and endocrine biology. *J. Endocrinol.*, 2005
- 17 Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ. The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005
- 18 Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, 2004
- 19 Wilfred BR, Wang W-X, Nelson PT. Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways. *Mol. Genet. Metab.*, 2007
- 20 Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS ONE*, 2008
- 21 Keller A, Leidinger P, Bauer A, Elsharawy A, Haas J, Backes C, Wendschlag A, Giese N, Tjaden C, Ott K, Werner J, Hackert T, Ruprecht K, Huwer H, Huebers J, Jacobs G, Rosenstiel P, Dommisch H, Schaefer A, Müller-Quernheim J, Wullich B, Keck B, Graf N, Reichrath J, Vogel B, Nebel A, Jager SU, Staehler P, Amarantos I, Boisguerin V, Staehler C, Beier M, Scheffler M, Büchler MW, Wischhusen J, Haeusler SFM, Dietl J, Hofmann S, Lenhof H-P, Schreiber S, Katus HA, Rottbauer W, Meder B, Hoheisel JD, Franke A, Meese E. Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat. Methods*, 2011
- 22 Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005
- 23 Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*, 2012
- 24 Hydbring P, Badalian-Very G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Res*, 2013
- 25 Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 2010
- 26 Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008
- 27 Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer*, 2011

- 28 Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006
- 29 Fasanaro P, Greco S, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. microRNA: emerging therapeutic targets in acute ischemic diseases. *Pharmacol. Ther.*, 2010
- 30 Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic microRNA strategies in human cancer. *AAPS J*, 2009
- 31 Seto AG. The road toward microRNA therapeutics. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2010
- 32 Trang P, Weidhaas JB, Slack FJ. MicroRNAs as potential cancer therapeutics. *Oncogene*, 2008
- 33 Wahid F, Khan T, Kim YY. MicroRNA and diseases: therapeutic potential as new generation of drugs. *Biochimie*, 2014
- 34 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*; 75 (5); 75 (5): 843–854, 1993
- 35 Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2000
- 36 Ruvkun G. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, 2001
- 37 Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. *Cell*; 116 (2 Suppl); 116 (2 Suppl): S89-92, 1 p following S96, 2004
- 38 Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001
- 39 Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001
- 40 Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 2001
- 41 Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000
- 42 www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed; Stand: abgerufen zuletzt am 19.01.2020
- 43 Lee Y. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 2002

- 44 Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.*, 2008
- 45 Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001
- 46 Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.*, 2004
- 47 Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, 2004
- 48 Kim Y-K, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.*, 2007
- 49 Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 2005
- 50 Martinez NJ, Ow MC, Reece-Hoyes JS, Barrasa MI, Ambros VR, Walhout AJM. Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Res.*, 2008
- 51 Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, Zhang X, Song JS, Fisher DE. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.*, 2008
- 52 Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: Non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*, 2010
- 53 Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006
- 54 Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003
- 55 Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J.*, 2005
- 56 Filippov V, Solovyev V, Filippova M, Gill SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*; 245 (1); 245 (1): 213–221, 2000
- 57 Yeom K-H, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 2006
- 58 Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007
- 59 Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007
- 60 Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, 2005

- 61 Meister G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.*, 2013
- 62 Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 2007
- 63 Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell*, 2007
- 64 Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*, 2009
- 65 Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2006
- 66 Lee HY, Zhou K, Smith AM, Noland CL, Doudna JA. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing. *Nucleic Acids Res.*, 2013
- 67 Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 2003
- 68 Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 2003
- 69 Noland CL, Ma E, Doudna JA. siRNA repositioning for guide strand selection by human Dicer complexes. *Mol. Cell*, 2011
- 70 Iwasaki S, Kobayashi M, Yoda M, Sakaguchi Y, Katsuma S, Suzuki T, Tomari Y. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell*, 2010
- 71 Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuhashi I, Meshi T, Ishikawa M. In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell*, 2010
- 72 Johnston M, Geoffroy M-C, Sobala A, Hay R, Hutvagner G. HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells. *Mol. Biol. Cell*, 2010
- 73 Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell*, 2007
- 74 Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonautes. *Nat. Chem. Biol.*, 2007
- 75 Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2008
- 76 Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou M-M. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, 2003

- 77 Song J-J, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, 2003
- 78 Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*, 2006
- 79 Pillai RS, Artus CG, Filipowicz W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA*, 2004
- 80 Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.*, 2011
- 81 Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006
- 82 Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 2007
- 83 Nielsen CB, Shomron N, Sandberg R, Hornstein E, Kitzman J, Burge CB. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA*, 2007
- 84 Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010
- 85 Derry MC, Yanagiya A, Martineau Y, Sonenberg N. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006
- 86 Gallie DR. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene*; 216 (1); 216 (1): 1–11, 1998
- 87 Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol*, 2002
- 88 Olsen PH, Ambros V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, 1999
- 89 Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human *let-7a* miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006
- 90 Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 2006
- 91 Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2006

- 92** Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 2005
- 93** Humphreys DT, Westman BJ, Martin, David I K, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005
- 94** Zdanowicz A, Thermann R, Kowalska J, Jemielity J, Duncan K, Preiss T, Darzynkiewicz E, Hentze MW. Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression. *Mol Cell*, 2009
- 95** Ding XC, Grosshans H. Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins. *EMBO J.*, 2009
- 96** Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, Biffo S, Merrick WC, Darzynkiewicz E, Pillai RS, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 2007
- 97** Zekri L, Huntzinger E, Heimstadt S, Izaurralde E. The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol Cell Biol*, 2009
- 98** Fabian MR, Mathonnet G, Sundermeier T, Mathys H, Zipprich JT, Svitkin YV, Rivas F, Jinek M, Wohlschlegel J, Doudna JA, Chen C-YA, Shyu A-B, Yates, John R 3rd, Hannon GJ, Filipowicz W, Duchaine TF, Sonenberg N. Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation. *Mol Cell*, 2009
- 99** Derry MC, Yanagiya A, Martineau Y, Sonenberg N. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006
- 100** Rehwinkel J, Behm-Ansmant I, Gatfield D, Izaurralde E. A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA*, 2005
- 101** Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*, 2006
- 102** Piao X, Zhang X, Wu L, Belasco JG. CCR4-NOT deadenylates mRNA associated with RNA-induced silencing complexes in human cells. *Mol. Cell. Biol.*, 2010
- 103** Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 2004
- 104** Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 2008

- 105** Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 2008
- 106** Aleman LM, Doench J, Sharp PA. Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA*, 2007
- 107** Schmitter D, Filkowski J, Sewer A, Pillai RS, Oakeley EJ, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W. Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells. *Nucleic Acids Res*, 2006
- 108** Dancygier H. *Klinische Hepatologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen*. 1 Aufl. Berlin: Springer Berlin; 2014
- 109** Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci*, 2004
- 110** Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink R P, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt N M, van Roon M A. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*; 75 (3); 75 (3): 451–462, 1993
- 111** Mariotti V, Strazzabosco M, Fabris L, Calvisi DF. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018
- 112** Trauner M, Fickert P, Baghdasaryan A, Claudel T, Halilbasic E, Moustafa T, Wagner M, Zollner G. New insights into autoimmune cholangitis through animal models. *Dig Dis*, 2010
- 113** Hillebrand et al. BALB-ABCB4 KNOCKOUT MICE AS NEW MODEL FOR SPONTANEOUS LIVER FIBROGENESIS: GENETIC STRAIN DIFFERENCES DETERMINE SEVERITY OF FIBROSIS. *Hepatology*; (42); (42): 599, 2005
- 114** Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, Lammert F, Langner C, Zatloukal K, Marschall H-U, Denk H, Trauner M. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in *Mdr2* (*Abcb4*) knockout mice. *Gastroenterology*; 127 (1); 127 (1): 261–274, 2004
- 115** Mauad TH, van Nieuwkerk, Carin M. J., Dingemans KP, Smit, Jaap J. M., Schinkel AH, Notenboom, Robbert G. E., van den Bergh Weerman, Marius A., Verkruijsen RP, Groen AK, Oude Elferink, Ronald P. J., van der Valk, Martin A., Borst P, Offerhaus, G. Johan A. Mice with Homozygous Disruption of the *mdr2* P-Glycoprotein Gene A Novel Animal Model for Studies of Nonsuppurative Inflammatory Cholangitis and Hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*; 145 (5); 145 (5): 1237–1245, 1994
- 116** Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Weiglein AH, Lammert F, Marschall H-U, Tsybrovskyy O, Zatloukal K, Denk H, Trauner M. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and *Mdr2* knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology*; 123 (4); 123 (4): 1238–1251, 2002

- 117** Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, Lammert F, Langner C, Zatloukal K, Marschall H-U, Denk H, Trauner M. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*; 127 (1); 127 (1): 261–274, 2004
- 118** Lammert F, Wang DQ-H, Hillebrandt S, Geier A, Fickert P, Trauner M, Matern S, Paigen B, Carey MC. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2^{-/-} mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology*, 2004
- 119** Katzenellenbogen M, Mizrahi L, Pappo O, Klopstock N, Olam D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Galun E, Goldenberg D. Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice. *Mol Cancer Res*, 2007
- 120** Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M. ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *J. Hepatol.*, 2012
- 121** Jacquemin E, de Vree, J M, Cresteil D, Sokal EM, Sturm E, Dumont M, Scheffer GL, Paul M, Burdelski M, Bosma PJ, Bernard O, Hadchouel M, Elferink RP. The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology*; 120 (6); 120 (6): 1448–1458, 2001
- 122** Degiorgio D, Colombo C, Seia M, Porcaro L, Costantino L, Zazzeron L, Bordo D, Coviello DA. Molecular characterization and structural implications of 25 new ABCB4 mutations in progressive familial intrahepatic cholestasis type 3 (PFIC3). *Eur J Hum Genet*, 2007
- 123** Deleuze JF, Jacquemin E, Dubuisson C, Cresteil D, Dumont M, Erlinger S, Bernard O, Hadchouel M. Defect of multidrug-resistance 3 gene expression in a subtype of progressive familial intrahepatic cholestasis. *Hepatology*, 1996
- 124** Ziol M, Barbu V, Rosmorduc O, Frassati-Biaggi A, Barget N, Hermelin B, Scheffer GL, Bennouna S, Trinchet J-C, Beaugrand M, Ganne-Carrié N. ABCB4 heterozygous gene mutations associated with fibrosing cholestatic liver disease in adults. *Gastroenterology*, 2008
- 125** de Vree, J M, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink, R P, Hadchouel M. Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 95 (1); 95 (1): 282–287, 1998
- 126** Rosmorduc O, Hermelin B, Poupon R. MDR3 gene defect in adults with symptomatic intrahepatic and gallbladder cholesterol cholelithiasis. *Gastroenterology*; 120 (6); 120 (6): 1459–1467, 2001
- 127** Jacquemin E. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis*, 2001

- 128** Trauner M, Fickert P, Wagner M. MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Semin Liver Dis*, 2007
- 129** Reichert MC, Lammert F. ABCB4 Gene Aberrations in Human Liver Disease: An Evolving Spectrum. *Semin Liver Dis*, 2018
- 130** Fernández-Ramos D, Fernández-Tussy P, Lopitz-Otsoa F, Gutiérrez-de-Juan V, Navasa N, Barbier-Torres L, Zubiete-Franco I, Simón J, Fernández AF, Arbelaz A, Aransay AM, Lavín JL, Beraza N, Perugorria MJ, Banales JM, Villa E, Fraga MF, Anguita J, Avila MA, Berasain C, Iruzieta P, Crespo J, Lu SC, Varela-Rey M, Mato JM, Delgado TC, Martínez-Chantar ML. MiR-873-5p acts as an epigenetic regulator in early stages of liver fibrosis and cirrhosis. *Cell Death Dis*, 2018
- 131** Shifeng H, Danni W, Pu C, Ping Y, Ju C, Liping Z. Circulating liver-specific miR-122 as a novel potential biomarker for diagnosis of cholestatic liver injury. *PLoS ONE*, 2013
- 132** Song K-H, Li T, Owsley E, Chiang, John Y L. A putative role of micro RNA in regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase expression in human hepatocytes. *J Lipid Res*, 2010
- 133** Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, Suchy FJ, Wang DQ-H, Ananthanarayanan M, Ford DA, Baldán A. miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Mol Med*, 2012
- 134** Li T, Francl JM, Boehme S, Chiang JYL. Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 α -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice. *Hepatology*, 2013
- 135** Kuipers F, Stroeve, Johanna H M, Caron S, Staels B. Bile acids, farnesoid X receptor, atherosclerosis and metabolic control. *Curr Opin Lipidol*, 2007
- 136** Zhang Y, Gong W, Dai S, Huang G, Shen X, Gao M, Xu Z, Zeng Y, He F. Down-regulation of human farnesoid X receptor by miR-421 promotes proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Mol. Cancer Res.*, 2012
- 137** de Aguiar Vallim, Thomas Q, Tarling EJ, Kim T, Civelek M, Baldan A, Esau C, Edwards PA. MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. *Circ Res*, 2013
- 138** Castro RE, Ferreira DMS, Afonso MB, Borralho PM, Machado MV, Cortez-Pinto H, Rodrigues CMP. miR-34a/SIRT1/p53 is suppressed by ursodeoxycholic acid in the rat liver and activated by disease severity in human non-alcoholic fatty liver disease. *J. Hepatol.*, 2013

- 139** Li J, Zhang Y, Kuruba R, Gao X, Gandhi CR, Xie W, Li S. Roles of microRNA-29a in the antifibrotic effect of farnesoid X receptor in hepatic stellate cells. *Mol. Pharmacol.*, 2011
- 140** Lee CG, Kim YW, Kim EH, Meng Z, Huang W, Hwang SJ, Kim SG. Farnesoid X receptor protects hepatocytes from injury by repressing miR-199a-3p, which increases levels of LKB1. *Gastroenterology*, 2012
- 141** Dai B-H, Geng L, Wang Y, Sui C-J, Xie F, Shen R-X, Shen W-F, Yang J-M. microRNA-199a-5p protects hepatocytes from bile acid-induced sustained endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Dis*, 2013
- 142** Lino Cardenas, Christian Lacks, Henaoui IS, Courcot E, Roderburg C, Cauffiez C, Aubert S, Copin M-C, Wallaert B, Glowacki F, Dewaeles E, Milosevic J, Maurizio J, Tedrow J, Marcet B, Lo-Guidice J-M, Kaminski N, Barbry P, Luedde T, Perrais M, Mari B, Pottier N. miR-199a-5p Is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet.*, 2013
- 143** Yamaura Y, Nakajima M, Takagi S, Fukami T, Tsuneyama K, Yokoi T. Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis. *PLoS ONE*, 2012
- 144** Kanda T, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mishima T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Shimizu T, Arima Y, Yokomuro S, Yoshida H, Tajiri T, Uchida E, Takizawa T. Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. *Hepatogastroenterology*; 57 (102-103); 57 (102-103): 1013–1023, 2010
- 145** World Health Organization. Hepatitis B Key facts. Im Internet: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b; Stand: 19.07.2019, abgerufen am 19.01.2020
- 146** Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin, Yvan J F, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, 2006
- 147** Moticka EJ. A historical perspective on evidence based immunology. Amsterdam: Elsevier; 2016
- 148** Hilleman MR, McAleer WJ, Buynak EB, McLean AA. The preparation and safety of hepatitis B vaccine. *J Infect*; 7 Suppl 1; 7 Suppl 1: 3–8, 1983
- 149** Buynak EB. Vaccine Against Human Hepatitis B. *JAMA*, 1976
- 150** Blumberg BS, Melartin L, Guint RA, Werner B. Family studies of a human serum isoantigen system (Australia antigen). *Am J Hum Genet*; 18 (6); 18 (6): 594–608, 1966
- 151** Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*; 1 (7649); 1 (7649): 695–698, 1970

- 152** Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. *Molekulare Virologie*. 3 Aufl. Heidelberg, Neckar: Spektrum Akademischer Verlag; 2008.
- 153** Prange R. Host factors involved in hepatitis B virus maturation, assembly, and egress. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2012
- 154** Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia M-A. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol. Biol.*, 2010
- 155** Doerr HW, Gerlich WH. *Medizinische Virologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010
- 156** Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, Huang Y, Qi Y, Peng B, Wang H, Fu L, Song M, Chen P, Gao W, Ren B, Sun Y, Cai T, Feng X, Sui J, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 2012
- 157** Beck J. Hepatitis B virus replication. *WJG*, 2007
- 158** Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*, 2006
- 159** Rivière L, Ducroux A, Buendia MA. The oncogenic role of hepatitis B virus. *Recent Results Cancer Res.*, 2014
- 160** Guidotti LG, Ishikawa T, Hobbs MV, Matzke B, Schreiber R, Chisari FV. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*; 4 (1); 4 (1): 25–36, 1996
- 161** Mason WS, Litwin S, Xu C, Jilbert AR. Hepatocyte turnover in transient and chronic hepadnavirus infections. *J Viral Hepat*, 2007
- 162** Kuntz E, Kuntz H-D. *Hepatology: Textbook and atlas : history, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy*. 3 Aufl. Heidelberg: Springer; 2008.
- 163** Liang TJ. *Hepatitis B: the virus and disease*. Hepatology, 2009
- 164** Hyams KC. Risks of Chronicity Following Acute Hepatitis B Virus Infection: A Review. *Clinical Infectious Diseases*, 1995
- 165** Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathology. *Springer Semin Immunopathol*; 17 (2-3); 17 (2-3): 261–281, 1995
- 166** Saikia N, Talukdar R, Mazumder S, Khanna S, Tandon R. Management of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Postgrad Med J*, 2007
- 167** Robert-Koch-Institut. RKI-Ratgeber für Ärzte: Hepatitis B und D. Im Internet: www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisB.html; Stand: 20.05.2016, abgerufen am 19.01.2020
- 168** Ringelhan M, O'Connor T, Protzer U, Heikenwalder M. The direct and indirect roles of HBV in liver cancer: Prospective markers for HCC screening and potential therapeutic targets. *J Pathol*, 2015

- 169** Tokino T, Tamura H, Hori N, Matsubara K. Chromosome deletions associated with hepatitis B virus integration. *Virology*; 185 (2); 185 (2): 879–882, 1991
- 170** Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: From genes to environment. *Nature Reviews Cancer*, 2006
- 171** Dandri M, Volz TK, Lutgehetmann M, Petersen J. Animal models for the study of HBV replication and its variants. *J Clin Virol*; 34 Suppl 1; 34 Suppl 1: S54-62, 2005
- 172** Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology*, 1996
- 173** Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B–like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*; 29 (2); 29 (2): 403–415, 1982
- 174** Tennant BC, Toshkov IA, Peek SF, Jacob JR, Menne S, Hornbuckle WE, Schinazi RD, Korba BE, Cote PJ, Gerin JL. Hepatocellular carcinoma in the woodchuck model of hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*; 127 (5 Suppl 1); 127 (5 Suppl 1): S283-93, 2004
- 175** Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature*, 1985
- 176** Lu M, Hilken G, Kruppenbacher J, Kemper T, Schirmbeck R, Reimann J, Roggen-
dorf M. Immunization of woodchucks with plasmids expressing woodchuck hepatis-
tis virus (WHV) core antigen and surface antigen suppresses WHV infection. *J Virol*; 73 (1); 73 (1): 281–289, 1999
- 177** Garcia-Navarro R, Blanco-Urgoiti B, Berraondo P, Sanchez de la Rosa, R, Vales A, Hervas-Stubbs S, Lasarte JJ, Borrás F, Ruiz J, Prieto J. Protection against woodchuck hepatitis virus (WHV) infection by gene gun coimmunization with WHV core and interleukin-12. *J Virol*, 2001
- 178** Tennant BC, Gerin JL. The Woodchuck Model of Hepatitis B Virus Infection. *ILAR Journal*, 2001
- 179** Galle PR, Hagelstein J, Kommerell B, Volkmann M, Schranz P, Zentgraf H. In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology*; 106 (3); 106 (3): 664–673, 1994
- 180** Schulze-Bergkamen H, Untergasser A, Dax A, Vogel H, Buchler P, Klar E, Lehnert T, Friess H, Buchler MW, Kirschfink M, Stremmel W, Krammer PH, Müller M, Protzer U. Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol*; 38 (6); 38 (6): 736–744, 2003
- 181** Dandri M, Lutgehetmann M, Volz T, Petersen J. Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Semin Liver Dis*, 2006
- 182** Li H, Zhuang Q, Wang Y, Zhang T, Zhao J, Zhang Y, Zhang J, Lin Y, Yuan Q, Xia N, Han J. HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cell. Mol. Immunol.*, 2014

- 183** Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, Brinster RL. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*; 230 (4730); 230 (4730): 1157–1160, 1985
- 184** Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 84 (19); 84 (19): 6909–6913, 1987
- 185** Gerber MA, Hadziyannis S, Vissoulis C, Schaffner F, Paronetto F, Popper H. Electron microscopy and immunoelectronmicroscopy of cytoplasmic hepatitis B antigen in hepatocytes. *Am J Pathol*; 75 (3); 75 (3): 489–502, 1974
- 186** Churin Y, Roderfeld M, Roeb E. Hepatitis B virus large surface protein: Function and fame. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015
- 187** Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell*, 1989
- 188** Jin W-B, Wu F-L, Kong D, Guo A-G. HBV-encoded microRNA candidate and its target. *Comput Biol Chem*, 2007
- 189** Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*; 12 (9); 12 (9): 735–739, 2002
- 190** Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol*, 2008
- 191** Chen Y, Shen A, Rider PJ, Yu Y, Wu K, Mu Y, Hao Q, Liu Y, Gong H, Zhu Y, Liu F, Wu J. A liver-specific microRNA binds to a highly conserved RNA sequence of hepatitis B virus and negatively regulates viral gene expression and replication. *FASEB J*, 2011
- 192** Song K, Han C, Zhang J, Lu D, Dash S, Feitelson M, Lim K, Wu T. Epigenetic regulation of MicroRNA-122 by peroxisome proliferator activated receptor-gamma and hepatitis b virus X protein in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 2013
- 193** Wang S, Qiu L, Yan X, Jin W, Wang Y, Chen L, Wu E, Ye X, Gao GF, Wang F, Chen Y, Duan Z, Meng S. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) -modulated P53 activity. *Hepatology*, 2012
- 194** Wang Y, Lu Y, Toh ST, Sung W-K, Tan P, Chow P, Chung, Alexander Y F, Jooi, London L P, Lee, Caroline G L. Lethal-7 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and targets signal transducer and activator of transcription 3. *J Hepatol*, 2010

- 195** Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *Biomed Res Int*, 2013
- 196** Roderfeld M, Padem S, Lichtenberger J, Quack T, Weiskirchen R, Longerich T, Schramm G, Churin Y, Irungbam K, Tschuschner A, Windhorst A, Grevelding CG, Roeb E. Schistosoma mansoni Egg-Secreted Antigens Activate Hepatocellular Carcinoma-Associated Transcription Factors c-Jun and STAT3 in Hamster and Human Hepatocytes. *Hepatology*, 2018
- 197** Wei X, Xiang T, Ren G, Tan C, Liu R, Xu X, Wu Z. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell Signal*, 2013
- 198** Zhang T, Zhang J, Cui M, Liu F, You X, Du Y, Gao Y, Zhang S, Lu Z, Ye L, Zhang X. Hepatitis B Virus X Protein Inhibits Tumor Suppressor miR-205 through Inducing Hypermethylation of miR-205 Promoter to Enhance Carcinogenesis¹². *Neoplasia*; 15 (11); 15 (11): 1282–1291, 2013
- 199** Jin J, Tang S, Xia L, Du R, Xie H, Song J, Fan R, Bi Q, Chen Z, Yang G, Liu J, Shi Y, Fan D. MicroRNA-501 promotes HBV replication by targeting HBXIP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013
- 200** Zhang X, Zhang E, Ma Z, Pei R, Jiang M, Schlaak JF, Roggendorf M, Lu M. Modulation of hepatitis B virus replication and hepatocyte differentiation by MicroRNA-1. *Hepatology*, 2011
- 201** Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, Levrero M. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*, 2006
- 202** Belloni L, Pollicino T, Nicola F de, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, Levrero M. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009
- 203** Guo H, Liu H, Mitchelson K, Rao H, Luo M, Xie L, Sun Y, Zhang L, Lu Y, Liu R, Ren A, Liu S, Zhou S, Zhu J, Zhou Y, Huang A, Wei L, Guo Y, Cheng J. MicroRNAs-372/373 promote the expression of hepatitis B virus through the targeting of nuclear factor I/B. *Hepatology*, 2011
- 204** Potenza N, Papa U, Mosca N, Zerbini F, Nobile V, Russo A. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Res*, 2011
- 205** Zhang G-l, Li Y-x, Zheng S-q, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res.*, 2010

- 206** Huang J, Wang Y, Guo Y, Sun S. Down-regulated microRNA-152 induces aberrant DNA methylation in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by targeting DNA methyltransferase 1. *Hepatology*, 2010
- 207** Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2009
- 208** Roderburg C, Urban G-W, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C, Luedde T. MicroRNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology*, 2011
- 209** Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchaikovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, Rogler LE, Zavolan M, Tuschl T, Rogler CE. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am. J. Pathol.*, 2008
- 210** Ling M, Li Y, Xu Y, Pang Y, Shen L, Jiang R, Zhao Y, Yang X, Zhang J, Zhou J, Wang X, Liu Q. Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- κ B in arsenite-induced cell transformation. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012
- 211** Zhao J, Tang N, Wu K, Dai W, Ye C, Shi J, Zhang J, Ning B, Zeng X, Lin Y. MiR-21 simultaneously regulates ERK1 signaling in HSC activation and hepatocyte EMT in hepatic fibrosis. *PLoS ONE*, 2014
- 212** Wei J, Feng L, Li Z, Xu G, Fan X. MicroRNA-21 activates hepatic stellate cells via PTEN/Akt signaling. *Biomed. Pharmacother.*, 2013
- 213** Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 2008
- 214** Marquez RT, Bandyopadhyay S, Wendlandt EB, Keck K, Hoffer BA, Icardi MS, Christensen RN, Schmidt WN, McCaffrey AP. Correlation between microRNA expression levels and clinical parameters associated with chronic hepatitis C viral infection in humans. *Lab. Invest.*, 2010
- 215** Liu L-Z, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung H-F, Lai L, Jiang B-H. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PLoS ONE*, 2011
- 216** Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 2009

- 217** Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2014
- 218** Kanda T, Ishibashi O, Kawahigashi Y, Mishima T, Kosuge T, Mizuguchi Y, Shimizu T, Arima Y, Yokomuro S, Yoshida H, Tajiri T, Uchida E, Takizawa T. Identification of obstructive jaundice-related microRNAs in mouse liver. *Hepatogastroenterology*; 57 (102-103); 57 (102-103): 1013–1023, 2010
- 219** Zhang G-l, Li Y-x, Zheng S-q, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antiviral Res*, 2010
- 220** Ogawa T, Enomoto M, Fujii H, Sekiya Y, Yoshizato K, Ikeda K, Kawada N. MicroRNA-221/222 upregulation indicates the activation of stellate cells and the progression of liver fibrosis. *Gut*, 2012
- 221** Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS ONE*, 2011
- 222** Roderfeld M, Rath T, Voswinckel R, Dierkes C, Dietrich H, Zahner D, Graf J, Roeb E. Bone marrow transplantation demonstrates medullar origin of CD34+ fibrocytes and ameliorates hepatic fibrosis in *Abcb4*^{-/-} mice. *Hepatology*, 2010
- 223** Shigehara K, Yokomuro S, Ishibashi O, Mizuguchi Y, Arima Y, Kawahigashi Y, Kanda T, Akagi I, Tajiri T, Yoshida H, Takizawa T, Uchida E. Real-time PCR-based analysis of the human bile microRNAome identifies miR-9 as a potential diagnostic biomarker for biliary tract cancer. *PLoS ONE*, 2011
- 224** Song G, Zeng H, Li J, Xiao L, He Y, Tang Y, Li Y. miR-199a regulates the tumor suppressor mitogen-activated protein kinase kinase 11 in gastric cancer. *Biol Pharm Bull*; 33 (11); 33 (11): 1822–1827, 2010
- 225** Hou J, Lin L, Zhou W, Wang Z, Ding G, Dong Q, Qin L, Wu X, Zheng Y, Yang Y, Tian W, Zhang Q, Wang C, Zhang Q, Zhuang S-M, Zheng L, Liang A, Tao W, Cao X. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 2011
- 226** Hirata H, Ueno K, Shahryari V, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. Oncogenic miRNA-182-5p targets Smad4 and RECK in human bladder cancer. *PLoS ONE*, 2012
- 227** Segura MF, Hanniford D, Menendez S, Reavie L, Zou X, Alvarez-Diaz S, Zakrzewski J, Blochin E, Rose A, Bogunovic D, Polsky D, Wei J, Lee P, Belitskaya-Levy I, Bhardwaj N, Osman I, Hernando E. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009

- 228** Sachdeva M, Mito JK, Lee C-L, Zhang M, Li Z, Dodd RD, Cason D, Luo L, Ma Y, van Mater D, Gladdy R, Lev DC, Cardona DM, Kirsch DG. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes. *J. Clin. Invest.*, 2014
- 229** Zahner D, Glimm H, Matono T, Churin Y, Herebian D, Mayatepek E, Köhler K, Gattenlöhner S, Stinn A, Tschuschner A, Roderfeld M, Roeb E. Hepatitis B virus surface proteins accelerate cholestatic injury and tumor progression in Abcb4-knockout mice. *Oncotarget*, 2017
- 230** Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 2005
- 231** Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006
- 232** Zhang Z, Li Z, Gao C, Chen P, Chen J, Liu W, Xiao S, Lu H. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab. Invest.*, 2008
- 233** Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006
- 234** Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu C-G, Alder H, Calin GA, Menard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 2007
- 235** Lui W-O, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*, 2007
- 236** Tetzlaff MT, Liu A, Xu X, Master SR, Baldwin DA, Tobias JW, Livolsi VA, Baloch ZW. Differential expression of miRNAs in papillary thyroid carcinoma compared to multinodular goiter using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Endocr Pathol*, 2007
- 237** Krichevsky AM, Gabriely G. miR-21: a small multi-faceted RNA. *J. Cell. Mol. Med.*, 2009
- 238** Li C, Wang Y, Wang S, Wu B, Hao J, Fan H, Ju Y, Ding Y, Chen L, Chu X, Liu W, Ye X, Meng S. Hepatitis B virus mRNA-mediated miR-122 inhibition upregulates PTTG1-binding protein, which promotes hepatocellular carcinoma tumor growth and cell invasion. *J Virol*, 2013
- 239** Wang S, Qiu L, Yan X, Jin W, Wang Y, Chen L, Wu E, Ye X, Gao GF, Wang F, Chen Y, Duan Z, Meng S. Loss of microRNA 122 expression in patients with hepatitis B enhances hepatitis B virus replication through cyclin G(1) -modulated P53 activity. *Hepatology*, 2012

- 240** Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, Kellum JM, Min H, Luketic VA, Sanyal AJ. Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression. *Hepatology*, 2008
- 241** Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006
- 242** Li J, Ghazwani M, Zhang Y, Lu J, Li J, Fan J, Gandhi CR, Li S. miR-122 regulates collagen production via targeting hepatic stellate cells and suppressing P4HA1 expression. *J. Hepatol.*, 2013
- 243** Hsu S-h, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J. Clin. Invest.*, 2012
- 244** Filipowicz W, Grosshans H. The liver-specific microRNA miR-122: biology and therapeutic potential. *Prog Drug Res*; 67; 67: 221–238, 2011
- 245** Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. MIR23A (microRNA 23a). Im Internet: atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR23A.html
- 246** Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. MIR23B (microRNA 23b). Im Internet: atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_MIR23B.html
- 247** Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, Wang Y, Qian Z, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Le Beau MM, Larson RA, Golub TR, Rowley JD, Chen J. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007
- 248** Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassan M, Bassi P, Sevignani C, Byrne D, Negrini M, Pagano F, Gomella LG, Croce CM, Baffa R. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol*, 2007
- 249** Liu T, Tang H, Lang Y, Liu M, Li X. MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin. *Cancer Lett.*, 2009
- 250** Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006
- 251** Huang S, He X, Ding J, Liang L, Zhao Y, Zhang Z, Yao X, Pan Z, Zhang P, Li J, Wan D, Gu J. Upregulation of miR-23a approximately 27a approximately 24 decreases transforming growth factor-beta-induced tumor-suppressive activities in human hepatocellular carcinoma cells. *Int. J. Cancer*, 2008

- 252** Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, Liu C-G, Bhatt D, Taccioli C, Croce CM. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*, 2007
- 253** Pan Z, Sun X, Shan H, Wang N, Wang J, Ren J, Feng S, Xie L, Lu C, Yuan Y, Zhang Y, Wang Y, Lu Y, Yang B. MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor- β 1 pathway. *Circulation*, 2012
- 254** Tu X, Zhang H, Zhang J, Zhao S, Zheng X, Zhang Z, Zhu J, Chen J, Dong L, Zang Y, Zhang J. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF β signaling pathway. *J. Pathol.*, 2014
- 255** Tu X, Zhang H, Zhang J, Zhao S, Zheng X, Zhang Z, Zhu J, Chen J, Dong L, Zang Y, Zhang J. MicroRNA-101 suppresses liver fibrosis by targeting the TGF β signaling pathway. *J. Pathol.*, 2014
- 256** Sheng Y, Ding S, Chen K, Chen J, Wang S, Zou C, Zhang J, Cao Y, Huang A, Tang H. Functional analysis of miR-101-3p and Rap1b involved in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Biochem. Cell Biol.*, 2014
- 257** Su H, Yang J-R, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang S-M. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res.*, 2009
- 258** Liu J-J, Lin X-J, Yang X-J, Zhou L, He S, Zhuang S-M, Yang J. A novel AP-1/miR-101 regulatory feedback loop and its implication in the migration and invasion of hepatoma cells. *Nucleic Acids Res*, 2014
- 259** Lin C, Huang F, Li Q-Z, Zhang Y-J. miR-101 suppresses tumor proliferation and migration, and induces apoptosis by targeting EZH2 in esophageal cancer cells. *Int J Clin Exp Pathol*; 7 (10); 7 (10): 6543–6550, 2014
- 260** Tao J, Ji J, Li X, Ding N, Wu H, Liu Y, Wang XW, Calvisi DF, Song G, Chen X. Distinct anti-oncogenic effect of various microRNAs in different mouse models of liver cancer. *Oncotarget*; 6 (9); 6 (9): 6977–6988, 2015
- 261** Zhang K, Zhang Y, Ren K, Zhao G, Yan K, Ma B. MicroRNA-101 inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by downregulation of EZH2 expression. *Oncol Rep*, 2014
- 262** Zheng F, Liao Y-J, Cai M-Y, Liu T-H, Chen S-P, Wu P-H, Wu L, Bian X-W, Guan X-Y, Zeng Y-X, Yuan Y-F, Kung H-F, Xie D. Systemic delivery of microRNA-101 potently inhibits hepatocellular carcinoma in vivo by repressing multiple targets. *PLoS Genet.*, 2015

- 263** van Nieuwerk CMJ, Groen AK, Ottenhoff R, van Wijland M, van den Bergh Weerman, Marius A., Tytgat GNJ, Offerhaus JJA, Oude Elferink RPJ. The role of bile salt composition in liver pathology of *mdr2* (-/-) mice: Differences between males and females. *Journal of Hepatology*, 1997
- 264** Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, Dengler U, Hall J, Filipowicz W, Weiler J. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 2007
- 265** Mattie MD, Benz CC, Bowers J, Sensinger K, Wong L, Scott GK, Fedele V, Ginzinger D, Getts R, Haqq C. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies. *Mol. Cancer*, 2006
- 266** Zhao S, Zhang Y, Zheng X, Tu X, Li H, Chen J, Zang Y, Zhang J. Loss of microRNA-101 Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Hepatocytes. *J. Cell. Physiol.*, 2015
- 267** Chen Y, Gelfond JAL, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics*, 2009
- 268** Koshiol J, Wang E, Zhao Y, Marincola F, Landi MT. Strengths and limitations of laboratory procedures for microRNA detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010
- 269** Baffa R, Fassan M, Volinia S, O'Hara B, Liu C-G, Palazzo JP, Gardiman M, Rugge M, Gomella LG, Croce CM, Rosenberg A. MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets. *J Pathol*, 2009
- 270** Avissar M, Christensen BC, Kelsey KT, Marsit CJ. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 2009
- 271** Mees ST, Mardin WA, Wendel C, Baeumer N, Willscher E, Senninger N, Schleicher C, Colombo-Benkmann M, Haier J. EP300--a miRNA-regulated metastasis suppressor gene in ductal adenocarcinomas of the pancreas. *Int J Cancer*, 2010
- 272** Cancer Prevention Research Institute of Texas. A Multicenter Phase I Study of MRX34, MicroRNA miR-RX34 Liposomal Injection: This is a study to evaluate the safety of MRX34 in patients with primary liver cancer or those with liver metastasis from other cancers. The drug is given intravenously, twice per week for three weeks in a row and then one week off. Additionally patients with hematologic malignancies will be evaluated on a treatment schedule of five days in a row with two weeks off. Im Internet: clinicaltrials.gov/show/NCT01829971

- 273** Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2005
- 274** Kong W, Zhao J-J, He L, Cheng JQ. Strategies for profiling microRNA expression. *J. Cell. Physiol.*, 2009
- 275** Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*, 2009
- 276** Chisari FV, Pinkert CA, Milich DR, Filippi P, McLachlan A, Palmiter RD, Brinster RL. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*; 230 (4730); 230 (4730): 1157–1160, 1985
- 277** Chisari FV, Klopchin K, Moriyama T, Pasquinelli C, Dunsford HA, Sell S, Pinkert CA, Brinster RL, Palmiter RD. Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell*; 59 (6); 59 (6): 1145–1156, 1989
- 278** Jin Z, Sun R, Wei H, Gao X, Chen Y, Tian Z. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: involvement of natural killer T cells. *Hepatology*, 2011
- 279** Spano D, Cimmino F, Capasso M, D'Angelo F, Zambrano N, Terracciano L, Iolascon A. Changes of the hepatic proteome in hepatitis B-infected mouse model at early stages of fibrosis. *J. Proteome Res.*, 2008
- 280** Hillebrandt S, Goos C, Matern S, Lammert F. Genome-wide analysis of hepatic fibrosis in inbred mice identifies the susceptibility locus Hfib1 on chromosome 15. *Gastroenterology*, 2002
- 281** Shi Z, Wakil AE, Rockey DC. Strain-specific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997
- 282** Reifenberg K, Löhler J, Pudollek HP, Schmitteckert E, Spindler G, Köck J, Schlicht HJ. Long-term expression of the hepatitis B virus core-e- and X-proteins does not cause pathologic changes in transgenic mice. *J. Hepatol.*; 26 (1); 26 (1): 119–130, 1997
- 283** Smith, J. et al. Homozygous Disruption of the Murine m&2 P-Glycoprotein Gene Leads to a Complete Absence of Phospholipid from Bile and to Liver Disease. *Cell*; (75); (75): 451–462, 1993
- 284** Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*; 15 (3); 15 (3): 532-4, 536-7, 1993
- 285** Qiagen. miRNeasy Mini Handbook. Im Internet: www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=632801fb-abc5-4e62-b954-ff51f126a34f&lang=en; Stand: 19.01.2020

- 286** Thermo Scientific. NanoDrop 1000 Spectrophotometer: V3.8 User's Manual. Im Internet: tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf; Stand: 19.01.2020
- 287** Gallagher SR, Desjardins PR. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr Protoc Mol Biol*, 2006
- 288** Richter G. *Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken* ; 19 Tabellen. Thieme; 2003
- 289** Clark DP, Pazdernik NJ. *Molecular Biology*. Academic Press; 2012
- 290** Thomas JM, Hodes ME. A new discontinuous buffer system for the electrophoresis of cationic proteins at near-neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 1981
- 291** Waring MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*; 13 (1); 13 (1): 269–282, 1965
- 292** Aaij C, Borst P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta*; 269 (2); 269 (2): 192–200, 1972
- 293** Borst P. Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: how it started. *IUBMB Life*, 2005
- 294** Qiagen H. *miScript® miRNA PCR Array Handbook*
- 295** Riccelli PV, Merante F, Leung KT, Bortolin S, Zastawny RL, Janeczko R, Benight AS. Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res*; 29 (4); 29 (4): 996–1004, 2001
- 296** Life Technologies Corporation 01.2013. Protocol for Creating Custom RT and Pre-amplification Pools using TaqMan® MicroRNA Assays User Bulletin (Pub. no. 4465407 Rev. C)
- 297** Fakruddin M, Mannan, Khanjada Shahnewaj Bin, Chowdhury A, Mazumdar RM, Hossain MN, Islam S, Chowdhury MA. Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *J Pharm Bioallied Sci*, 2013
- 298** Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988
- 299** Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, Gelfand DH. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Research*, 1993
- 300** Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.*; 127 (3); 127 (3): 1550–1557, 1976

- 301** Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 2004
- 302** Bustin S. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2000
- 303** Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001
- 304** Kiss T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*; 109 (2); 109 (2): 145–148, 2002
- 305** Applied Biosystems. Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays.
- 306** Qiagen. miScript miRNA PCR Array Data Analysis. Qiagen
- 307** Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*; 29 (9); 29 (9): e45, 2001

7 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der JustusLiebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt.

Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Hamburg, 10.02.2020



Tilman Würger

8 Danksagung

Aufrichtig danke ich Frau Prof. Dr. Elke Roeb, Leiterin des Schwerpunktes Gastroenterologie des Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, einerseits für die Möglichkeit, in ihrer Arbeitsgruppe wissenschaftlich tätig zu sein, andererseits für die stets freundliche Art, das Engagement und die fachliche Kompetenz. Ohne ihre Geduld wäre der Abschluss dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Yuri Churin, welcher in der Formulierung des Themas der vorliegenden Arbeit federführend war und bei jeglichen Fragen und Schwierigkeiten, ob theoretischer oder praktischer Natur, mit großem Wissen helfend zur Seite stand. Darüberhinaus weiß ich auch die zahlreichen Gespräche abseits der Laborroutine sehr zu schätzen.

Ebenso danke ich PD Dr. rer. nat. Martin Roderfeld für die Leitung des Labors unserer Arbeitsgruppe, für die zweifelsohne zwischenzeitlich erforderliche Motivation sowie für die persönlichen Konversationen auch in nichtwissenschaftlicher Umgebung.

Für die Einführung in die Laborarbeit mit Erlernung neuer Techniken, die zahllosen beantworteten Fragen und Hilfestellungen möchte ich mich ganz herzlich bei Annette Tschuschner, Katharina Kopsch und Sandra Kremer bedanken.

Zuletzt richte ich das Wort an meine Mitdoktoranden Alica, Fabian, Frauke, Katharina, Katrin und Sravanthi: Vielen Dank für die gemeinsame Zeit im Labor!