

Neue Methoden und Forschungs-Ansätze zur Bedeutung von microRNAs in der Leber und in Hepatozyten

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Jessica Karin Rieger

aus Marbach am Neckar

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

16.05.2012

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Laufer

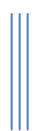
2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich M. Zanger

Für meine Eltern.

I) INHALTSVERZEICHNIS

I)	Inhaltsverzeichnis.....	i
II)	Abkürzungen.....	v
III)	Zusammenfassung.....	viii
1	Einleitung.....	1
1.1	MicroRNA	1
1.1.1	Geschichtliches zur microRNA Forschung.....	1
1.1.2	MicroRNA-Biogenese	2
1.1.3	Mechanismen der Genregulation durch microRNAs	4
1.2	Datenbanken für microRNA Bindestellen	6
1.3	ADME Gen-Regulation durch microRNAs.....	7
1.4	Nukleäre Rezeptoren.....	9
1.4.1	Gallensäuren und nukleare Rezeptoren	10
1.5	Cholestase	11
1.6	Hepatozyten	12
1.7	Lentivirales System und RNAi	12
2	Material	15
2.1	Puffer und Lösungen für SDS- PAGE und Westernblot.....	15
2.2	Chemikalien	17
2.3	Verwendete Kits.....	19
2.4	Geräte	20
2.5	Laborbedarf	21
2.6	Plasmide, Primer und Antikörper	22
2.7	TaqMan® Primer und Probe.....	24
2.7.1	TaqMan® microRNA Assays	24
2.7.2	TaqMan® mRNA Assays (ADME Array)	27
2.8	Zelllinien und Zellkulturmedien	28
2.8.1	Zelllinien	28
2.9	Software	30
3	Methoden	31
3.1	<i>In silico</i> Methoden.....	31
3.1.1	Entwicklung des MIRNA-DISTILLER	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	31



3.2.1	Klonierung	31
3.2.2	Plasmidpräparation (Mini Präp)	32
3.2.3	Sequenzierung	32
3.2.4	Luciferase Reporter gen Konstrukte	33
3.3	Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.1	Proteinbestimmung	35
3.3.2	Durchführung einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	35
3.3.3	Proteintransfer	36
3.3.4	Immunoblot	37
3.4	Zellkultur Methoden	38
3.4.1	Kultivierung der Zellen	38
3.4.2	Zellzahlbestimmung	38
3.4.3	Kotransfektion für Reporter gen-Assays in HEK293 Zellen	38
3.4.4	Luciferase Assay	39
	Virusexperimente (S2-Arbeiten)	40
3.4.5	Virusproduktion	40
3.4.6	Titerbestimmung	41
3.4.7	Transduktion von Hepatozyten mit lentiviralen Partikeln	42
3.4.8	Transduktion von Hepatozyten mit lentiviralen Partikeln und anschließende Agonistenbehandlung	43
3.5	Leberbank	43
3.5.1	Isolierung von microRNAs aus humaner Leber	44
3.5.2	Qualitätsbestimmung der microRNA Aufarbeitung	44
3.6	Methoden zur mRNA bzw. miRNA Quantifizierung	45
3.6.1	Reverse Transkription von microRNAs	45
3.6.2	Präamplifikation der mi-cDNA	45
3.6.3	Quantitative PCR für microRNAs Expression	46
3.6.4	cDNA Synthese für mRNA	46
3.7	Analytische Methoden	47
3.7.1	Aktivitätsmessungen der Cytochrom P450 Enzyme mit dem Cocktail-Assay	47
3.7.2	Cocktail-Assay Zusammensetzung und Anwendung	47
3.7.3	Eichgerade für den Cocktail Assay	48
3.8	Statistische Methoden	49
4	Ergebnisse	51
4.1	MIRNA-DISTILLER	51

4.1.1	Aufbau des MIRNA-DISTILLER am Beispiel der ADME Gene.....	52
4.1.2	Test und Optimierung des MIRNA-DISTILLER	56
4.1.3	Anwendungsbeispiel einer publizierten Gen-microRNA Interaktion zur Validierung von MIRNA-DISTILLER	57
4.1.4	Anwendung des MIRNA-DISTILLER auf ein ADME Genset.....	59
4.2	Überexpression und Herunterregulierung von microRNAs in primären humanen Hepatozyten mit lentiviralen Vektoren	61
4.2.1	Auswahl der zu untersuchenden microRNAs.....	61
4.2.2	Zeitreihe	63
4.2.3	Kontrollen für die Überexpression und den Knock-down der microRNAs	67
4.2.4	Überexpression und Knock-down der miR-143, miR-148a und miR-27b	68
4.2.5	Lentivirale miR-143 Überexpression und Knock-down in Hepatozyten	69
4.2.5.1	mRNA Quantifizierung.....	69
4.2.5.2	Proteinexpression.....	72
4.2.5.3	Cytochrom P450 Aktivitäten.....	73
4.2.5.4	Zusammenfassung der miR-143 Ergebnisse.....	74
4.2.5.5	Validierung für miR-143 mittels Reportergeren Assay für CYP2C8 und CYP3A4.....	75
4.2.6	Lentivirale miR-148a Überexpression und Knock-down in Hepatozyten	77
4.2.6.1	mRNA Quantifizierung.....	77
4.2.6.2	Proteinexpression.....	79
4.2.6.3	Cytochrom P450 Aktivitäten.....	80
4.2.6.4	Zusammenfassung der miR-148a Ergebnisse.....	81
4.2.6.5	Validierung für miR-148a mittels Reportergeren Assay für CYP2C8 und CYP3A4.....	82
4.2.7	Lentivirale miR-27b Überexpression und Knock-down in Hepatozyten	83
4.2.7.1	mRNA Quantifizierung.....	83
4.2.7.2	Proteinexpression.....	85
4.2.7.3	Cytochrom P450 Aktivitäten.....	86
4.2.7.4	Zusammenfassung der miR-27b Ergebnisse.....	87
4.2.7.5	Validierung für miR-27b mittels Reportergeren Assay für CYP2C8 und CYP3A4.....	88
4.3	Herunterregulierung und Agonistenbehandlung von CAR in primären humanen Hepatozyten mit lentiviralen shRNA Vektoren.....	89
4.3.1	Knock-down von CAR und Behandlung mit einem spezifischen CAR Agonist (CITCO) in humanen Hepatozyten.....	89
4.3.1.1	Quantifizierung der mRNA.....	90
4.3.1.2	Proteinexpression in den CAR Knock-down bzw. mit CITCO behandelten Hepatozyten	91



4.3.1.3	microRNA Expression in CAR Knock-down bzw. mit CITCO behandelten Hepatozyten	93
4.3.1.4	In silico Transkriptionsfaktor Analyse	96
4.4	MicroRNA Quantifizierung in humanem Lebergewebe	97
4.4.1	Quantifizierung der microRNAs im Hochdurchsatzverfahren	97
4.4.2	Korrelationen der nicht genetischen Faktoren mit microRNA Expressionen	97
4.4.3	Korrelationsanalysen der microRNA Expressionen mit SIRT1	101
4.4.4	HNF4a als validiertes Zielgen für miR-34a	104
4.4.5	HNF4a und Cholestase	106
5	Diskussion	107
5.1	Vorhersagedatenbanken für microRNA Bindestellen	107
5.2	Hepatozyten als Zellsystem zur Untersuchung der microRNA Regulation von ADME Genen	108
5.2.1	Lentivirale Transduktion von primären humanen Hepatozyten	109
5.3	Überexpression und Knock-down von microRNAs in primären humanen Hepatozyten	110
5.3.1	Effekte der miR-143 auf CAR, CYP2C8 und CYP2B6	112
5.4	miR-27b und CYP3A4	113
5.5	Regulation der microRNAs durch nukleäre Rezeptoren	114
5.6	MicroRNAs in Cholestase	116
5.6.1	HNF4a als Zielgen der miR-34a in Cholestase	117
5.7	MicroRNAs als Biomarker	118
5.8	Schlussfolgerung	119
6	Literatur	121
7	Veröffentlichungen	128
7.1	Publikationen	128
7.2	Buchkapitel	128
7.3	SOP für das virtuelle Leber Datenmanagement	128
7.4	Konferenzvorträge	128
7.5	Posterpräsentationen	129
8	Erklärung	130
9	Danksagung	131
10	Anhang	133



II) ABKÜRZUNGEN

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
3'UTR	3' untranslatierte Region
5'UTR	engl.: 5' untranslatierte Region
ABC	engl.: ATP binding cassette
ABCB1	engl.: ATP-binding cassette, sub-family B member 1 (siehe MDR)
ABCC2	engl.: ATP-binding cassette, sub-family C member 2 (siehe MRP)
Ago2	Argonauten Protein 2
AHR	engl.: aryl-hydrocarbon receptor
AHRR	engl.: aryl-hydrocarbon receptor repressor
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	engl.: aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin
CAR	engl.: constitutive androstane receptor
CDS	coding sequence
CITCO	6-(4-Chlorophenyl)imidazo[2,1-b][1,3] thiazol-5-carbaldehyd-O-(3,4-dichlorobenzyl)oxim
CREBBP	engl.: cAMP (Adenosine 3'5' Cyclic Monophosphate) Response Element-Binding Protein
CYP	Cytochrom-monooxygenase P450
Da	Dalton
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos Phosphat Buffered Saline
DPYD	engl.: dihydropyrimidine dehydrogenase
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.:	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	engl.: fluoreszenz activated cell sorting
FKS	Fötales Kälberserum
FOXO1	engl.: Forkhead box protein O1
FXR	engl.: Farnesoid X Receptor (siehe NR1H4)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HMGCR	engl.: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase

HNF1a	engl.: hepatocyte nuclear factor 1, alpha
HNF4a	engl.: hepatocyte nuclear factor 4, alpha
HPLC	high performance liquid chromatography
INSIG1	engl.: insulin induced gene 1
INSIG2	engl.: insulin induced gene 2
kDa	Kilodalton
l	Liter
log	Logarithmus
LXR	engl.: Liver X Receptor
M	Molar
MEM	Modifiziertes Eagle Medium
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA/miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i>
MRP	engl.: Multidrug Resistance-related Protein
NADP+	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat
ng	Nanogramm
NROB2	engl.: nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2 (siehe SHP)
NR1H3	engl.: nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (siehe LXR)
NR1H4	engl.: nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4 (siehe FXR)
NR1I2	engl.: nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2 (siehe PXR)
NR1I3	engl.: nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3 (siehe CAR)
NR3C1	engl.: nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (siehe GR)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pmol	Picomol
POR	engl.: P450 (cytochrome) oxidoreductase
PPARA	engl.: peroxisome proliferator-activated receptor alpha
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primäre microRNA
PXR	engl.: Pregnan X Receptor
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
rpm	revolutions per minute
RXRA	engl.: retinoid X receptor, alpha
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHP	engl.: small heterodimer partner

SIRT1	Sitrulin1
SLC10A1	engl.: solute carrier family 10 (H ⁺ /peptide transporter) member 1
SLC22A7	engl.: solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7
SLCO1B1	engl.: solute carrier organic anion transporter family 1B, member 1
SREBF1	engl.: sterol regulatory element binding transcription factor 1
SREBF2	engl.: sterol regulatory element binding transcription factor 2
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitanfettsäureester
UGT1A1	engl.: UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
UV	ultraviolett
V	Volt
VDR	engl.: vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor (NR111)
µg	Microgramm
µL	Microliter
µm	Micrometer

III) ZUSAMMENFASSUNG

MicroRNAs sind einzelsträngige, nicht kodierende RNA Moleküle mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden, die durch Bindung an Erkennungssequenzen einer Ziel-mRNA deren Translation und/oder Stabilität beeinflussen können. Schätzungsweise 50% aller Gene in nahezu allen zellulären Prozessen werden post-transkriptionell durch microRNAs reguliert. Eine veränderte microRNA Expression kann mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sein wie beispielsweise Krebs oder neurodegenerative Erkrankungen. Einige neuere Beispiele zeigen, dass microRNAs auch die Expression von so genannten ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion) Genen, die für den Fremdstoffmetabolismus eine herausragende Rolle spielen, beeinflussen können. ADME Gene sind hoch variabel, da sie komplexen Regulationsmechanismen, genetischen Polymorphismen und anderen Einflussfaktoren unterliegen. Die inter-bzw. intraindividuelle Variabilität dieser Gene konnte jedoch bisher nicht vollständig durch genetische Polymorphismen oder andere Mechanismen (z.B. der transkriptionellen Genregulation) erklärt werden. Dies trifft insbesondere für Gene zu, bei denen genetische Marker weitgehend fehlen (z.B. CYP3A4), so dass eine Prädiktion beim einzelnen Patienten daher nahezu ausgeschlossen ist. Die Identifizierung neuer Regulationsmechanismen könnte daher neue diagnostische oder therapeutische Möglichkeiten zur Verbesserung von Arzneimittelwirkungen und/oder Verhinderung von unerwünschten Arzneimittelwirkungen eröffnen.

Da microRNAs erstmalig vor ungefähr 10 Jahren entdeckt wurden und demzufolge die Methoden zur Untersuchung von microRNAs und deren Funktionen noch limitiert sind, war es im Rahmen dieser Arbeit notwendig, neue Strategien und Methoden zur Untersuchung von microRNA Regulationsmechanismen in der Leber zu entwickeln und zu etablieren. Hierfür standen am Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie (IKP Stuttgart) eine humane Leberbank mit ca. 300 gut charakterisierten Leberproben zur Verfügung. Außerdem konnten humane Hepatozyten in Primärkultur verwendet werden, die von chirurgischen Zentren in Berlin, Regensburg und München erhalten wurden.



Zunächst wurden *in silico* Analysen mit bereits existierenden Vorhersagedatenbanken für microRNA Bindestellen in ADME Genen durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass ein Programm, welches Vorhersage-Ergebnisse verschiedener Datenbanken für mehrere Gene zusammenfassen und übersichtlich darstellen kann, nicht verfügbar war. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Programm MIRNA-DISTILLER entwickelt, welches Datenbankabfragen von drei öffentlichen Datenbanken automatisch durchführt und die ermittelten Ergebnisse integriert und lokal speichert (Rieger et al., 2011). Große Datenmengen können so übersichtlich und strukturiert dargestellt werden und sind jederzeit abrufbar. Zudem wurden diverse Filteroptionen entwickelt, um die im Programm befindlichen Daten sinnvoll zu reduzieren. Diese Option ermöglicht es erstmalig, durch Priorisierung geeignete Kandidaten für weitere Untersuchungen zu finden. Die meisten der in dieser Arbeit generierten Hypothesen wurden mittels MIRNA-DISTILLER generiert und die erhaltenen experimentellen Ergebnisse damit abgeglichen.

Des Weiteren wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Rolle von microRNAs bei der Regulation der Expression von fremdstoffmetabolisierenden Genen bzw. ADME Genen *in vitro* zu untersuchen und zu belegen. Durch Überexpression und Knock-down von in der Leber exprimierten microRNAs in primären humanen Hepatozyten und der anschließenden Analyse der Expression von ADME Genen wurden Änderungen auf mRNA, Protein und Aktivitätsebene detektiert und Rückschlüsse auf mögliche regulatorische Zusammenhänge gezogen. So zeigte sich insbesondere eine bisher unbekannte Regulation des Konstitutiven Androstan Rezeptors (CAR, NR1I3) und CYP2B6 durch miR-143. Mit Hilfe dieses Systems wurden weitere Einflüsse auf die Expression von ADME Genen durch Veränderungen der microRNA Konzentration von miR-143, miR-148a und miR-27b gezeigt.

Es stellte sich daraufhin die Frage, durch welche Faktoren die Expression von microRNAs selbst reguliert werden können. Eine naheliegende und durch die Literatur gestützte Möglichkeit stellte die Regulation der microRNAs durch nukleäre Rezeptoren dar. Exemplarisch wurden deshalb durch Verwendung von spezifischen shRNAs der nukleäre Rezeptor CAR in humanen Hepatozyten runterreguliert, und anschließend die Expressionsänderung von 380 microRNAs quantitativ bestimmt. Parallel dazu wurde CAR mittels des spezifischen Agonisten CITCO aktiviert. Die Ergebnisse der CAR-Aktivierung

konnten wiederum zur Überprüfung der Knock-down Experimente verwendet werden. Ein Knock-down von CAR zeigte einen Einfluss auf die Expression von einzelnen miRNAs, die zudem durch CITCO Behandlung eine gegensätzliche Regulation aufwiesen. Let-7f, miR-29b, let-7a, miR-101 und miR-181a wiesen im Mittel aus drei unabhängigen Hepatozyten-Experimenten eine erniedrigte Expression von mehr als 40% nach einem CAR Knock-down auf, sowie eine um 14 bis 42% erhöhte Expression in den CITCO behandelten Zellen. Eine deutliche Induktion der microRNA Expression nach einem CAR Knock-down war für miR-155, miR-223 und miR-501-5p mit über 50% erhöhter Expression und einer verringerten Expression in den CITCO behandelten Zellen zu verzeichnen. MiR-146a zeigte mit einer 180%igen Induktion den stärksten Effekt.

Durch diese Versuche wurde gezeigt, dass die Expression bestimmter microRNAs durch CAR reguliert wird. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass Medikamente, die Aktivatoren von CAR oder anderen nukleären Rezeptoren sind, eine Änderung des microRNA Profils in der Zelle zur Folge haben können. Ein verändertes microRNA Expressionsprofil kann umfangreiche Auswirkungen haben, wie beispielsweise die Entstehung von Krankheiten. Da es Medikamente gibt, die im direkten Zusammenhang mit der Entstehung von Krankheiten wie z.B. der Medikamenten-induzierten Cholestase stehen und diese Medikamente oft Aktivatoren von nukleären Rezeptoren sind, liegt es nahe, dass microRNAs an der Entstehung dieser Krankheiten beteiligt sein könnten.

Um dies zu untersuchen wurden in Proben der Leberbank 64 leberrelevante microRNAs quantifiziert. Zu den jeweiligen Patientenproben sind umfangreiche klinische, genetische und nicht-genetische Informationen verfügbar, die auch eine histologisch und laborchemisch fundierte Cholestase Diagnose beinhaltet. Mit den in den Leberproben quantifizierten microRNAs und unter Berücksichtigung der klinischen Meta-Daten der Donoren wurden Assoziationsanalysen durchgeführt. Dabei wurden starke Assoziationen von miR-130b, miR-132, miR-21 und miR-34 mit Cholestase entdeckt. Diese microRNAs waren ca. 3-fach in den Leberproben cholestatischer Patienten erhöht. Ein plausibler kausaler Zusammenhang zwischen diesen erhöhten microRNAs und Cholestase wurde mittels Literaturhinweisen bekannter Zielgene postuliert. Dabei fiel auf, dass SIRT1, eine NADP⁺-abhängige Deacetylase, sowohl von miR-132 als auch miR-34a negativ reguliert wird. SIRT1 wiederum



kann den nukleären Rezeptor FXR durch Deacetylierung aktivieren. Wird demzufolge SIRT1 durch erhöhte miR-132 bzw. miR-34a Expression runterreguliert, ist FXR inaktiv. Da FXR sämtliche mit Cholestase assoziierte Gene reguliert, könnte dies ein kritischer Faktor bei der Entstehung von Cholestase sein. Korrelationsanalysen der ermittelten miR-132 bzw. miR-34a Expressionswerten und der SIRT1 mRNA Expression wurden durchgeführt und bestätigten die publizierte Regulation. Darüber hinaus wurde eine starke negative Korrelation dieser microRNAs und FXR gefunden.

Ein weiteres, möglicherweise mit Cholestase in Verbindung stehende Zielgen von miR-34a ist der Hepatozyten nukleäre Faktor 4 alpha (HNF4a). Da HNF4a einer der wichtigsten Regulatoren der Leber ist, könnten Expressionsänderungen dieses Faktors möglicherweise zu einer veränderten Stoffwechsellage und demzufolge zu Cholestase führen. Korrelationsanalysen von HNF4a mRNA und Protein Expressionswerten mit miR-34a Expressionswerten bestätigten die zuvor *in vitro* gefundene negative Regulation der miR-34a und HNF4a auf Proteinebene erstmalig *ex vivo*. Darüber hinaus wurde in cholestatischen Lebern eine signifikant erniedrigte HNF4a Proteinexpression gefunden, wohingegen die mRNA in Cholestase erhöht war. Diese Diskrepanz ist durch die erhöhte miR-34a Expression erklärbar.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit verschiedene Methoden zur Untersuchung der ADME Genregulation *in silico*, *in vitro* und *ex vivo* entwickelt, durchgeführt und etabliert. Dadurch wurden sowohl wichtige Erkenntnisse zur miRNA Regulation von Genen, als auch zur Regulation der microRNA selbst gewonnen. Neben der Entwicklung eines neuen Programms (MIRNA-DISTILLER) zur interaktiven und integrativen Bearbeitung von microRNA Vorhersagedaten, wurden durch Assoziationsanalysen interessante Zusammenhänge von differenziell exprimierten microRNAs und Cholestase gefunden. Diese neuen Erkenntnisse könnten dazu beitragen, unerwartete Arzneimittelwirkungen besser zu verstehen und möglicherweise neue Diagnose- oder Therapieansätze für Krankheiten wie die Cholestase zu ermöglichen.



1 EINLEITUNG

1.1 MicroRNA

MicroRNAs (microRNAs) sind kleine, meist 22-25 Nukleotide lange, einzelsträngige RNA Moleküle. Durch partielle Bindung an die 3' untranslatierte Regionen (3'UTR) oder auch an kodierende Regionen von Ziel mRNAs greifen sie post-transkriptionell regulatorisch ein (Bartel, 2009). Im Menschen wurden bis heute mehrere hundert microRNAs identifiziert, die eine Vielzahl von proteinkodierenden Genen regulieren (Lim et al., 2005). Deshalb wird ihnen auch immer mehr Bedeutung bei der Untersuchung und Aufklärung von regulatorischen Mechanismen oder der Entstehung von Krankheiten geschenkt. Diskutierte Anwendungen sind microRNAs als Biomarker zur Früherkennung von Krebs oder anderen Krankheiten, da in verschiedensten Krankheiten oft ein verändertes Expressionsprofil vorliegt (Keller et al., 2011). Aber auch für die Medikamentenentwicklung und als Medikament selbst könnten microRNAs einen wichtigen Beitrag leisten (Lundstrom, 2011). Jedoch befindet sich die microRNA Forschung zur Entwicklung von Medikamenten im Moment noch am Anfang und es wird noch einige Zeit dauern bis miRNAs in der Standardtherapie eingesetzt werden. Deshalb ist es wichtig mehr über die Wirkungen und Zielgene von microRNAs herauszufinden, sowie über die Regulation der Expression von microRNAs. Darüber hinaus müssen weitere Erkenntnisse zur Rolle von microRNA in Krankheiten gewonnen werden, um ein besseres Verständnis für die Entstehung von Krankheiten im Zusammenhang mit microRNAs zu erlangen.

1.1.1 Geschichtliches zur microRNA Forschung

Erstmals wurde von (Lee et al., 1993) im Fadenwurm *C. elegans* eine kleine RNA, lin-4, beschrieben, die einen negativen regulatorischen Einfluss auf das Gen lin-14 hat. Diese RNA wurde zunächst als stRNA (*small temporal RNA*) bezeichnet. Nach Entdeckung einer weiteren regulatorischen RNA im Jahre 2000, let-7, die auch lin-14 reguliert und zudem in anderen Spezies vorkommt, wurde diesen kleinen RNAs mehr Aufmerksamkeit geschenkt und sie bekamen den Namen microRNA (Reinhart et al., 2000); (Lagos-Quintana et al., 2001). Seitdem wuchs das Interesse stetig und microRNAs werden heute in nahezu allen Bereichen der Forschung untersucht.

1.1.2 MicroRNA-Biogenese

Die Biogenese von microRNAs durchläuft mehrere Prozessierungsschritte (Abb. 1) und beginnt im Nukleus, wo die primäre-microRNA (pri-microRNA) durch die RNA-Polymerase II oder III transkribiert wird. Die für eine microRNA kodierende Sequenz kann im Genom mit eigenständigem Promotor lokalisiert vorliegen, in Clustern angeordnet sein oder aber im Intron eines proteinkodierenden Gens liegen. Intronic lokalisierte microRNAs nennt man Mirtrons (Berezikov et al., 2007); (Ruby et al., 2007) , die durch Splicing die pri-miRNA freisetzen. Diese pri-miRNA wird dann durch die RNase III (Drosha) (Borchert et al., 2006) und das doppelsträngige-RNA Bindeprotein (DGCR8) zur pre-microRNA, ein etwa 70 nt langes RNA Molekül, mit charakteristischer Haarnadelstruktur, prozessiert. Die pre-microRNA wird durch den nukleären Transporter Exportin 5 vom Nukleus ins Cytoplasma transportiert (Bohnsack et al., 2004). Eine Endonuklease, Dicer schneidet dort die pre-miRNA an spezifischen Erkennungssequenzen zu einem ca. 22 nt langen microRNA:microRNA*-Duplex. Dicer interagiert zudem mit dem ds-RNA-Bindeprotein TRBP, wodurch ATP-abhängig eine Entwindwindung des microRNA Duplex begünstigt wird und die beiden Stränge (miRNA:microRNA*) voneinander getrennt werden. Aufgrund der thermodynamischen Assymetrie der beiden RNA Stränge wird einer der beiden bevorzugt in den „RNA induced silencing complex“ (RISC) oder auch micro-Ribonukleoprotein Komplex (miRNP) genannt, inkorporiert (Schwarz et al., 2003), während der andere Strang abgebaut wird. Die im RISC inkorporierte miRNA kann dann an bestimmte Erkennungssequenzen (MREs; microRNA-recognition Elements), vorzugsweise in der 3'UTR einer Ziel-mRNA binden und regulieren (Bartel, 2004). Diese Regulation kann verschiedenen Mechanismen unterliegen und wird unter 1.1.3 näher erläutert.



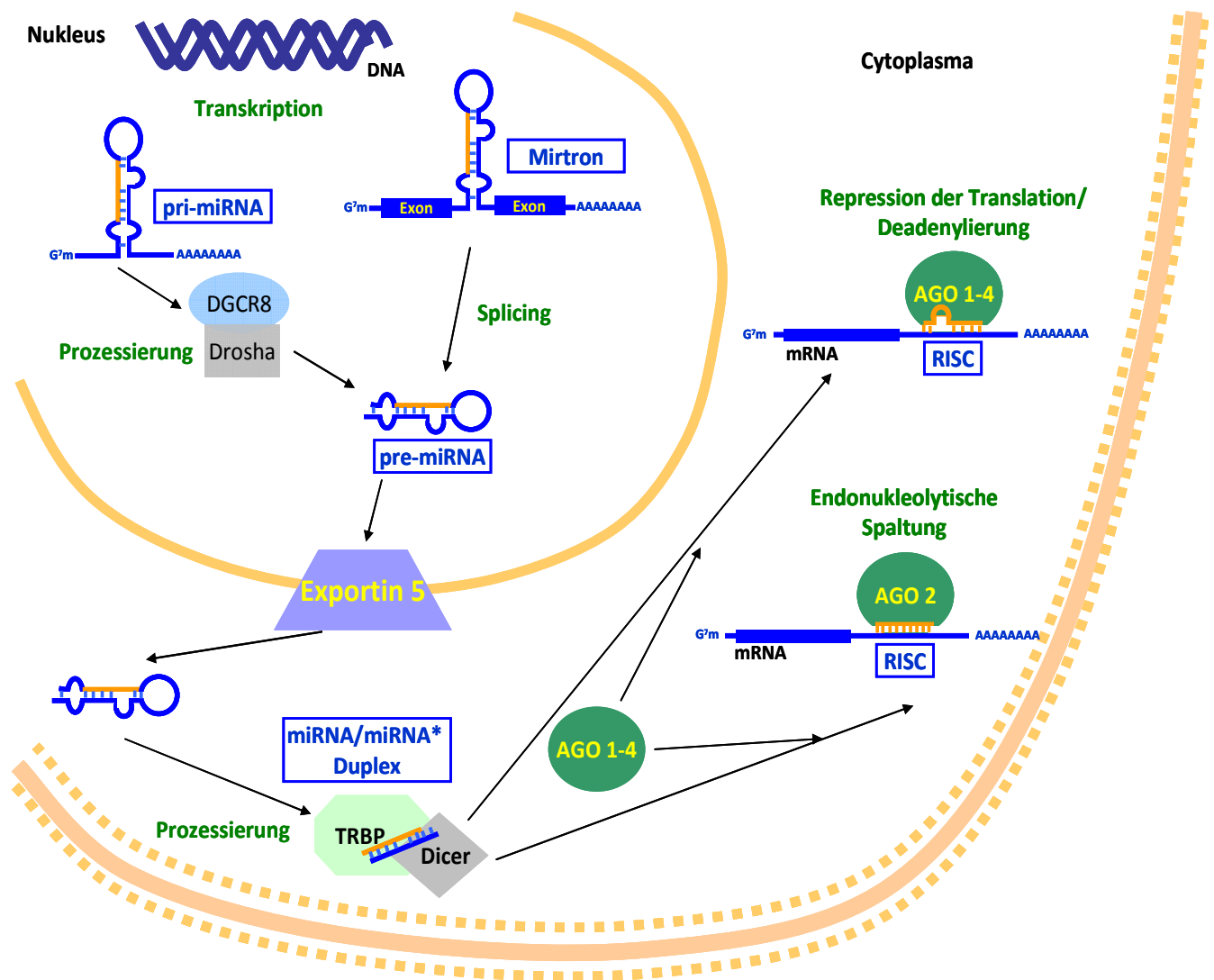
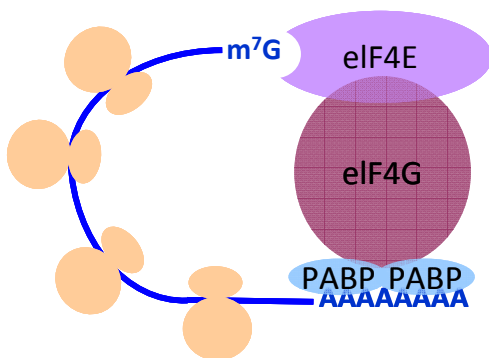


Abbildung 1: MicroRNA Biogenese: Im Nukleus werden microRNAs transkribiert oder aus einem Intron einer mRNA herausgeschnitten. Die pre-microRNA wird dann energieabhängig über Exportin 5 aus dem Nukleus ins Cytoplasma transportiert, wo sie weiter prozessiert wird und durch Bindung an AGO und weitere Proteine regulatorisch wirken kann. Abbildung angelehnt an (Filipowicz et al., 2008).

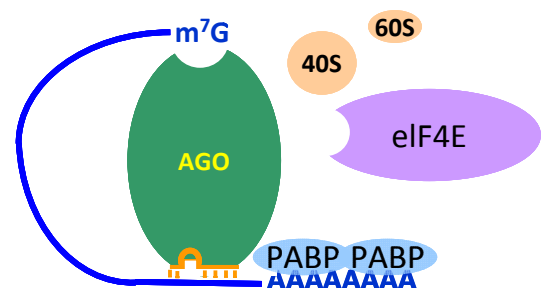
1.1.3 Mechanismen der Genregulation durch microRNAs

Der microRNA-Protein Komplex (RISC/miRNP) agiert durch partielle Hybridisierung, von 6-8 Basen in der 5'-proximalen „Seed“ Region der microRNA, an eine Erkennungssequenz (MRE) in der 3'UTR einer Ziel mRNA (Abb. 2a). Diese Bindung führt meist zu einer Inhibition der Translation. Die möglichen Mechanismen hierzu sind in Abbildung 2b, c und d dargestellt.

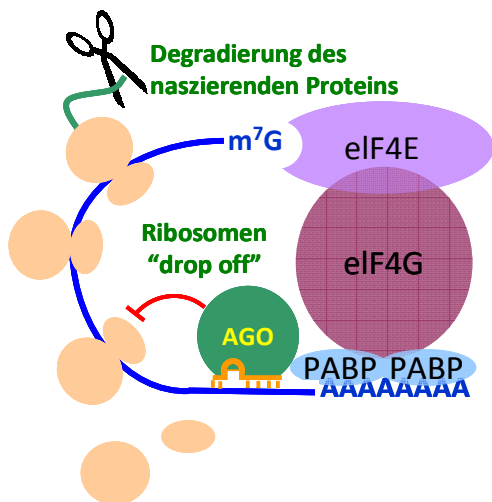
a) Aktive Translation



b) Inhibierung der Initiation



c) Post-Initiations Inhibierung



d) mRNA Deadenylierung

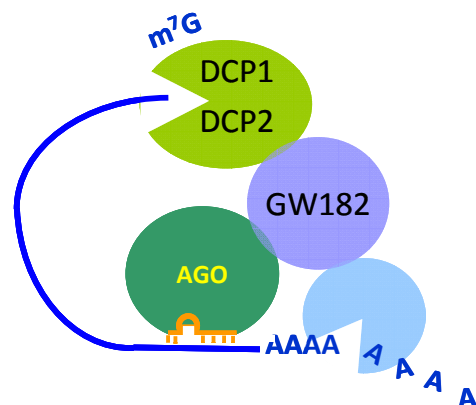


Abbildung 2: Verschiedene Mechanismen der post-transkriptionellen Regulation durch microRNAs (Meister and Tuschl, 2004).

eIF4E/4G: Elongationsfaktor 4E/4G; PABP: Poly(A) Bindepotein; m⁷G: 7-Methylguanotin;

AGO: Argonautenproteine; 40S/60S: Ribosomenuntereinheiten; CP1/2: Decapping Komplex

Inhibition der Initiation (Abb. 2b):

Durch Bindung des RISC an eine Erkennungssequenz am 3'-Ende einer Ziel mRNA kann die Initiation sterisch behindert werden, wodurch die Elongationsfaktoren nicht mehr binden können und die Translation inhibiert ist.

Post-Initiations Inhibierung (Abb. 2c):

Bei der Post-Initiations Inhibierung blockiert der RISC die Ribosomen Elongation was ein vermehrtes Abfallen der Ribosomen von der mRNA und eine verstärkte Proteolyse der naszierenden Polypeptide zur Folge hat.

mRNA Deadenylierung (Abb. 2d): Ein dritter beschriebener Mechanismus ist die mRNA Deadenylierung, der eine Abspaltung der methylierten Guanodin Kappe am 5' Ende folgt. Dieser Mechanismus führt zu einer Destabilisierung der mRNA und folglich zu deren beschleunigtem Abbau (Meister and Tuschl, 2004).

Es wurde allerdings auch gezeigt, dass sich MREs nicht nur in der 3'UTR befinden können, sondern auch in den kodierenden Regionen (CDS, coding sequence) einer mRNA (Forman and Collier, 2010). In Säugern wurde gezeigt, dass die Bindung des RISC in der kodierenden Region meist zur Inhibition der Translation führt (Takagi et al., 2010). Die Menge der mRNA bleibt hierbei unverändert, wohingegen sich die Proteinmenge verringert. Dies kann zu schlechten Korrelationen zwischen mRNA und Protein führen.

Des Weiteren wurde ein vom Zellzyklus abhängiger Mechanismus gezeigt, der im Zellzyklus Arrest zu einer Hochregulierung der mRNA nach RISC Bindung führt (Vasudevan et al., 2007). Die mechanistischen Details der microRNA vermittelten Regulation der Translation sind noch nicht vollständig verstanden. Unterschiedliche Studien mit unterschiedlichen Methoden führen immer wieder zu widersprüchlichen Ergebnissen (Fabian et al., 2010).



1.2 Datenbanken für microRNA Bindestellen

Zur Vorhersage von microRNA Bindestellen gibt es öffentliche Datenbanken, die durch spezifische Algorithmen microRNA Bindestellen berechnen können. Da jede Datenbank unterschiedliche Parameter zur Erstellung eines Algorithmus berücksichtigt, können sich Vorhersagen für ein Gen, von Datenbank zu Datenbank erheblich unterscheiden (Sethupathy et al., 2006). Nahezu jede Datenbank berechnet spezifische Scores, die als Richtwerte der Wahrscheinlichkeit einer microRNA Bindung an ein Zielgen zu verstehen sind. Faktoren zur Berechnung des Bindungsscore sind z.B. die Konservierung einer Region in verschiedenen Spezies oder die Hybridisierungsenergie zwischen microRNA und mRNA. Zudem wird die Anzahl der komplementären Basenpaarungen mit einbezogen, wobei 8mere höhere Scores erhalten als 7mere.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die Datenbanken TargetScan ((Lewis et al., 2005); (Grimson et al., 2007); (Friedman et al., 2009)), microCosm (Griffiths-Jones et al., 2006);(Griffiths-Jones et al., 2008), und miRDB (Wang, 2008) zur Vorhersage von Bindungsstellen verwendet, welche auch in MIRNA-DISTILLER (Rieger et al, 2011), einem selbst entworfenen Programm, implementiert wurden. Es gibt noch weiterer Datenbanken, die bereits validierte microRNA-Zielgeninteraktionen aus der Literatur zusammenfassen und bereitstellen, um funktionell relevante microRNAs zu repräsentieren. Beispielsweise stellt miRTarbase (Hsu et al., 2010) mehr als 3000 microRNA-Gen Interaktionen aus der Literatur bereit. Ebenso existieren Datenbanken, die Einzelnukleotid Polymorphismen (SNPs) in microRNAs bzw. Bindestellen für microRNAs bereitstellen (Patrocles, (Hiard et al., 2010)). Je nach Fragestellung können diese Datenbanken zur Generierung von Hypothesen hilfreich sein.



1.3 ADME Gen-Regulation durch microRNAs

Es wurde gezeigt, dass microRNAs eine große Rolle in verschiedensten zellulären Prozessen wie Differenzierung, Entwicklung und Apoptose spielen (Miranda et al., 2010). Deshalb liegt es auch nahe, dass eine veränderte microRNA Expression mit unterschiedlichen Krankheiten in Verbindung stehen kann. Bei Krebs wurde z.B. gezeigt, dass microRNAs als Onkogene (Onkomirs) oder Tumorsuppressoren fungieren können (Tie et al., 2011). Darüber hinaus wurde auch ein Zusammenhang von veränderter microRNA Expression und Adipositas (Ono, 2011) oder kardiovaskulären Erkrankungen (Elton et al., 2011) gezeigt. Durch zunehmendes Verständnis im Gebiet der microRNA Regulation und Erforschung von krankheitsassoziierten microRNAs wird es möglich werden, neue oder bessere therapeutische Ansätze und Strategien zu generieren. Früherkennung von Krankheiten oder Verbesserung der Diagnose von komplexen Erkrankungen, sowie eine individuelle Diagnose sind ebenso Möglichkeiten, in denen ein besseres Verständnis der post-transkriptionellen Regulation durch microRNAs hilfreich sein kann (McDermott et al., 2011).

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Einfluss von microRNAs auf die Regulation von Genen, die in der Aufnahme, der Verteilung, des Metabolismus und der Ausscheidung von Medikamenten (ADME Gene) eine Rolle spielen. So könnte Therapieversagen vorgebeugt, die Wirkung von Medikamenten verbessert oder gegebenenfalls individuell angepasst werden (Nakajima et al., 2011). Pharmakogenomische Studien beschränkten sich früher hauptsächlich auf phänotypische Auswirkungen von SNPs oder sogenannten Kopienzahlvariationen (copy number variations; CNV). Heute wird der post-transkriptionellen Regulationen durch microRNAs mehr und mehr Aufmerksamkeit geschenkt und sie finden somit auch Einzug in die pharmakogenomische Forschung (Noam Shomron, 2010). So können durchaus auch SNPs in der microRNA Sequenz selbst vorkommen, was zu einer verminderten miRNA Stabilität führen oder die Prozessierung beeinflussen kann (Gong et al., 2012). Aber auch SNPs in der 3' UTR von Genen sind bekannt, die wiederum mit differenziellen Expressionen assoziiert sein können, da sie mögliche Bindestellen für microRNAs zerstören oder neue Bindestellen bilden können. Das Enzym Dihydrofolat Reduktase (DHFR) ist ein Beispiel für ein Gen mit einer polymorphen 3'UTR, einem sogenannten miRSNP. Dieser SNP, der 14 nt von einer miR-24 „Seed“ Sequenz entfernt lokalisiert ist wurde mit einer Resistenz gegenüber Methotrexat (MTX), einem

Medikament, welches in der Behandlung von Krebs eingesetzt wird, assoziiert. Dieser miRSNP führt zu einer erhöhten DHFR Expression aufgrund einer gestörten Bindung des RISC Komplexes an die 3'UTR der DHFR mRNA, was in diesem Fall das Therapieversagen von MTX erklären kann (Mishra et al., 2007).

Auch für nukleäre Rezeptoren, die an der transkriptionellen Regulation von ADME Genen involviert sind gibt es Beispiele für microRNA Regulationen. Der Hepatozyten Nukleäre Faktor 4 alpha (HNF4a), ein Transkriptionsfaktor, der eine bedeutende Rolle in der Regulation von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und Transportern in der Leber einnimmt, wird durch miR-24 und miR-34a reguliert. Eine Überexpression dieser microRNAs führt zu einer verminderten HNF4a Expression und der Gene, die durch HNF4a reguliert werden. Diese microRNAs tragen möglicherweise zur Pathologie der Leber bei und könnten einen Einfluss auf das Ansprechen auf Medikamente haben (Takagi et al., 2010). Von (Wirsing et al., 2011) wurde die HNF4a Regulation durch miR-34a bestätigt und zusätzlich eine weitere Regulation durch miR-21 gefunden.

Ein weiterer nukleärer Rezeptor, der Pregnane X Rezeptor (PXR; NR1I2), der über 40 Gene kontrolliert, die mit dem Metabolismus und der Elimination von Medikamenten im Zusammenhang stehen, unterliegt einer miR-148a Regulation. Dies hat wiederum einen Einfluss auf die CYP3A4 und CYP2B6 Expressionslevels (Takagi et al., 2008). Auch der Vitamin D Rezeptor (VDR), ein weiterer transkriptioneller Regulator von CYP3A4, hat eine Bindestelle für miR-27b, genauso wie CYP3A4 selbst. Dies führt zu einer direkten und indirekten Regulation von CYP3A4 durch miR-27b ((Pan et al., 2009)). Weitere Zielgene von miR-27b sind z.B. CYP1B1 (Tsuchiya et al., 2006) und PPARg (Jennewein et al., 2010; Karbiener et al., 2009). MiR-27b könnte somit eine wichtige Rolle in der Leber spielen und möglicherweise eine Sonderfunktion im Medikamentenstoffwechsel einnehmen. Aber auch andere microRNAs zeigen Einfluss auf ADME Gene, so z.B. miR-378 bei der Regulation von CYP2E1 (Mohri et al., 2010) und miR-613 bei der Regulation von LXR (Ou et al., 2011). Diese Beispiele lassen vermuten, dass microRNAs in der Leber einen Einfluss auf die Pharmakogenomik haben.



1.4 Nukleäre Rezeptoren

Nukleäre Rezeptoren (NR) sind Transkriptionsfaktoren die durch Liganden aktiviert werden, was zu einer Regulation der Expression von Zielgenen führt, welche in verschiedensten Prozessen involviert sind. So regulieren NR die Reproduktion, Entwicklung und den Metabolismus von Fremdstoffen (Medikamente), endogenen Substanzen (Gallensäuren) (Zollner et al., 2010). Liganden können endogene Substanzen wie Hormone, aber auch Medikamente oder durch die Nahrung aufgenommene Substanzen sein. Bindung eines Liganden an die Ligandenbindedomäne (LBD) des NR führt zu einer Konformationsänderung und zu einer Rekrutierung von Koregulatoren was letztendlich in einer Dimerisierung des nukleären Rezeptors, Translokation in den Nukleus und einer DNA-Bindung an spezifische „DNA response elements“ (DRE) der genomischen DNA resultiert (Abb. 3). Nukleäre Rezeptoren können entweder Homodimere oder Heterodimere mit dem Dimerisierungspartner RXR bilden (Mangelsdorf and Evans, 1995).

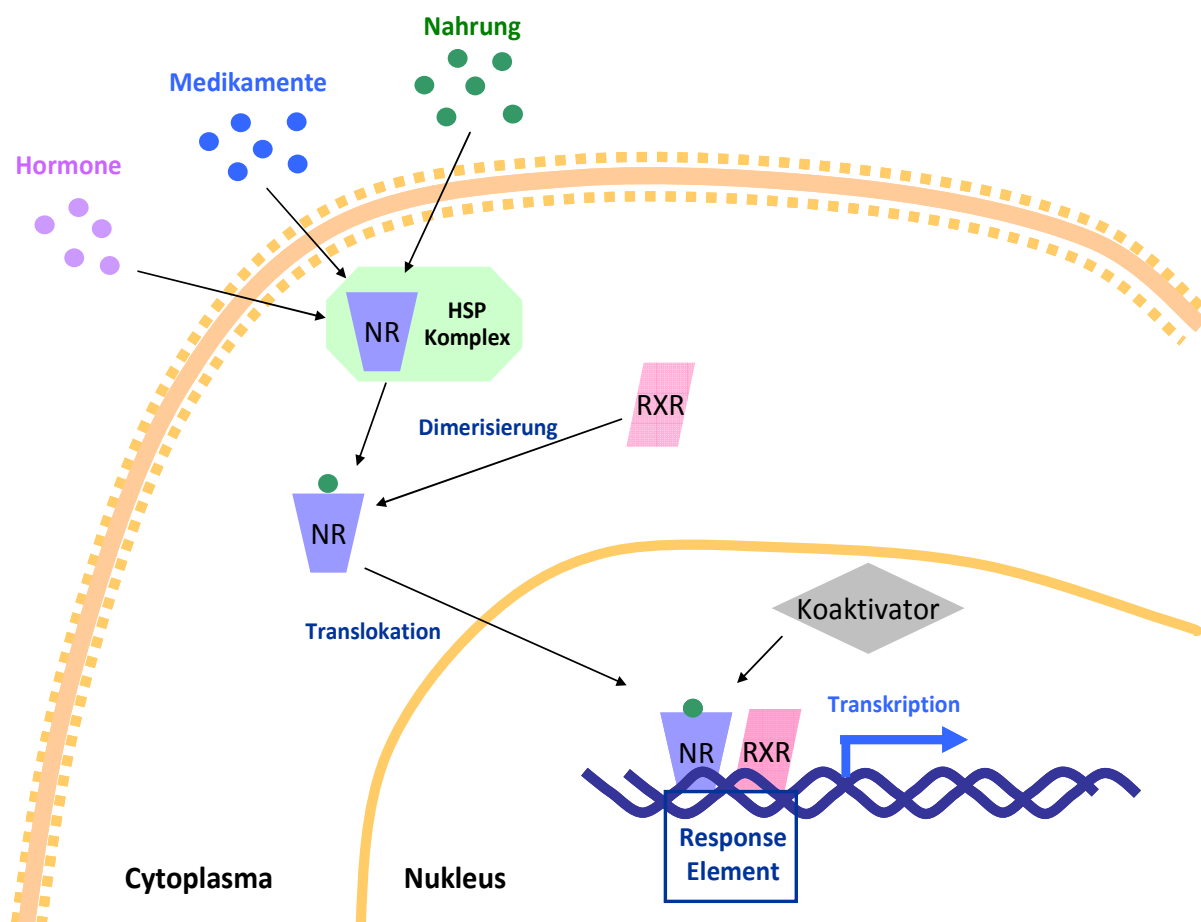


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Genregulation durch nukleäre Rezeptoren .

PXR und CAR sind die klassischen NR die durch Fremdstoffe oder Medikamente wie Rifampicin, Dexamethason, Statine und Johanniskraut (PXR) oder CITCO, Phenobarbital, TCPOBOP und Dimethoxycoumarin (CAR) aktiviert werden. PXR und CAR können aber auch durch endogene Liganden wie beispielsweise hydrophobe Gallensäuren (PXR) und Bilirubin (CAR) aktiviert werden. PXR und CAR spielen deshalb auch eine wichtige Rolle im Gallensäuremetabolismus (Giguère, 1999; Maglich et al., 2003 ; Zollner et al., 2010).

1.4.1 Gallensäuren und nukleare Rezeptoren

Gallensäuren sind nicht nur physiologische Detergenzien zur Begünstigung der Aufnahme, des Transports und der Verteilung von lipophilen Vitaminen oder Nahrungsfetten, sondern dienen auch als Signalmoleküle zur Aktivierung von nukleären Rezeptoren. Diese nukleären Rezeptoren regulieren meist den Gallensäure- und Cholesterolmetabolismus. Farnesoid X Rezeptor (FXR, NR1H4) und Liver X Rezeptor (LXR, NR1H3) sind dabei die wichtigsten Vertreter.

FXR wird durch Farnesol, all-trans-Retinsäure und TTBPB, ein Retinsäure Analog, aktiviert (Zavacki et al., 1997). Endogene Liganden sind hydrophobe Gallensäuren, wie Chenodesoxycholsäure, welche die stärksten Aktivierungseigenschaften besitzt. Sekundäre Gallensäuren wie Lithocholsäure und Desoxycholsäure sind weniger effektiv, hydrophile Gallensäuren wie Ursodeoxycholsäure und Muricholsäure sind inaktiv (Parks et al., 1999). FXR reguliert Gene der Gallensäuresynthese, des Transports und des Cholesterolmetabolismus. FXR wird aber auch post-translationell durch z.B. Acetylierung reguliert. Acetyliertes FXR ist demnach inaktiv, kann aber durch eine Deacetylase, wie beispielsweise Sirtulin 1 (SIRT1), deacetyliert werden. SIRT1 wiederum unterliegt weiteren Regulationsmechanismen, wie z.B. die microRNA Regulation. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl miR-34a als auch miR-132 SIRT1 regulieren und somit indirekt einen Einfluss auf die Aktivität von FXR haben (Lee and Kemper,2010; Strum et al., 2009).



LXR, ein weiterer wichtiger Regulator des Gallensäure- und Cholesterolmetabolismus, wird durch Oxysterole, welche Zwischenprodukte des Cholesterol und Gallensäurestoffwechsels sind, aktiviert und induziert Gene, die im reversen Cholesteroltransport involviert sind (Schroepfer, 2000). Auch LXR stellt, wie unter 1.3 erläutert, ein Zielgen für microRNA Regulation dar und wird auch durch SIRT1 deacetyliert (Li et al., 2007).

Die Aktivierung dieser NR durch Gallensäuren bzw. Bilirubin führt zu einer Induktion von Phase I und Phase II Enzyme wie CYP3A, CYP2B, CYP2C bzw. GSTs, UGTs und SULTs, sowie Transportern (Wada et al., 2009). Die damit verbundene verstärkte Metabolisierung und der Transport von toxischen Gallensäuren tragen zu einer schnelleren Detoxifizierung bei. Bei Störungen dieses regulatorischen Systems durch äußere Einflüsse oder durch genetische Prädispositionen, kann dies zu verschiedensten Krankheitsbildern, wie Cholestase führen.

1.5 Cholestase

Cholestase ist eine schwere Krankheit der Leber, die unbehandelt zu einer Leberzirrose führen kann. Ungefähr 15% der Lebertransplantationen sind auf cholestatische Erkrankungen der Leber zurückzuführen und sollten deshalb frühzeitig erkannt und behandelt werden (Penz-Österreicher et al., 2011).

Die Entwicklung einer Cholestase kann verschiedene Ursachen haben. Meist sind Beeinträchtigungen der Gallensekretion und -exkretion Ursachen für eine Akkumulation von toxischen Gallensäuren und Bilirubin in den Hepatozyten, was letztendlich zu ihrer Schädigung führen kann. Ein Rückstau von Gallensäuren kann durch eine mechanische Behinderung der Gallenwege, wie z.B. Gallensteine oder Tumore, entstehen (extrahepatische Cholestase). Intrahepatische Cholestasen entstehen häufig durch virusinduzierte Hepatitis, Giftstoffe oder Medikamente wie Steroide, Cyclosporin A oder Rifampicin, die z.B. den Transporter BSEP kompetitiv hemmen können (Stieger et al., 2000; Byrne et al., 2002).

Ein Symptom der Cholestase ist der Ikterus, eine Gelbfärbung der Augen und Haut, was auf die Anreicherung von Bilirubin zurückzuführen ist. Auch Störungen der Fettverdauung

(Fettstuhl), Anstieg des Cholesterinspiegels und Juckreiz, der durch den Anstieg der Gallensäuren entsteht, sind häufig vorkommende Symptome.

Es gibt zurzeit nur ein zugelassenes Medikament zur Behandlung von Cholestase. Dabei handelt es sich um Ursodeoxycholsäure, eine im Menschen natürlich vorkommende Gallensäure die ca. 3% der Gallensäuren ausmacht (Roma et al., 2011). Dieses Medikament ist jedoch nicht bei allen Formen der Cholestase oder bei jedem Patienten wirkungsvoll. Möglicherweise können Erkenntnisse über die molekularen Zusammenhänge in Cholestase einen weiteren Behandlungsansatz bieten und somit zu dringend benötigten weiteren Medikamenten führen.

1.6 Hepatozyten

Die humane Leber besteht zu 80% aus Hepatozyten, die an allen Stoffwechselfvorgängen beteiligt sind. Hepatozyten können auch im Labor zur Untersuchung von verschiedenen leberspezifischen Mechanismen oder Regulationen Verwendung finden und sind anderen Zelllinien, wie Hepatomazellen weit überlegen. Die Expression von wichtigen Phase I Enzymen ist in Hepatomazellen nicht oder kaum nachweisbar und sind daher nur bedingt für Untersuchungen des Medikamentenmetabolismus oder dessen Regulierung geeignet.

Hepatozyten können als Primärisolate aus Lebergewebe isoliert werden und anschließend in kollagenbeschichteten Kulturplatten für maximal zwei Wochen kultiviert werden. Die Zellen beginnen aber schon deutlich früher ihre leberspezifische Charakteristik zu verlieren. Werden diese Hepatozytenisolate von verschiedenen Spendern mit unterschiedlicher Vorgeschichten/Krankheiten, Alter und Geschlecht verwendet, ist mit einer interindividuellen Variabilität zu rechnen. Außerdem sind Schwankungen durch unterschiedliche Präparationen nicht auszuschließen, was eine Reproduktion von Experimenten im Gegensatz zu herkömmlichen Zellsystemen deutlich schwieriger gestaltet.

1.7 Lentivirales System und RNAi

Einige Zelllinien und primäre humane Hepatozyten lassen sich nur schlecht mit herkömmlichen Methoden mit RNA oder DNA transfizieren (Zamule et al., 2008). Mittels

einer lentiviralen Transduktion ist es jedoch möglich auch schwer zu transduzierende Zellen effektiv zu transduzieren.

Bei Lentiviren handelt es sich um Retroviren, welche in das Genom der Wirtszelle integrieren können. Dieses System setzt voraus, dass ein Viruspartikel mit dem gewünschten RNA-Konstrukt produziert werden kann, allerdings nicht mehr zu einer Replikation und zur Infektion von mehr als einer Zelle in der Lage ist. Dies ist durch diverse Deletionen und Mutationen des Virusgenoms möglich. Zudem werden die Virusgene auf drei verschiedene Vektoren verteilt, was eine weitere unkontrollierte Vermehrung außerhalb der Laborbedingungen unmöglich macht und somit die gentechnische Sicherheit erhöht. Trotzdem werden Lentiviren gemäß Gentechnikgesetz in die Sicherheitsstufe 2 (S2) eingestuft und dürfen demzufolge nur in einem dafür zugelassenen S2 Labor verwendet werden.

Der Mechanismus einer lentiviralen Infektion ist auf Abbildung 4 gezeigt. Der lentivirale Partikel ist in der Lage eine Wirtszelle zu infizieren und die in der Kapsel enthaltene virale RNA mit der zu transduzierenden Information (miRNA/siRNA Sequenz und GFP Reportergen) und die für die reverse Transkription und Integration benötigten Enzyme ins Cytoplasma abzugeben. Dort wird die virale RNA über einen RNA-DNA Hybrid zu einer Doppelstrang DNA revers transkribiert, die anschließend im Nukleus ins Wirtsgenom integriert wird. Die integrierte Sequenz besitzt zumeist einen eigenen CMV Promotor, der die Expression der miRNA/shRNA sichert. Des Weiteren befindet sich ein für GFP kodierende Sequenz unter der Kontrolle der CMV Promotors. Die Translation von GFP kann dann fluoreszenzmikroskopisch in Echtzeit verfolgt werden und als Reporter für die miRNA/shRNA Expression genutzt werden.



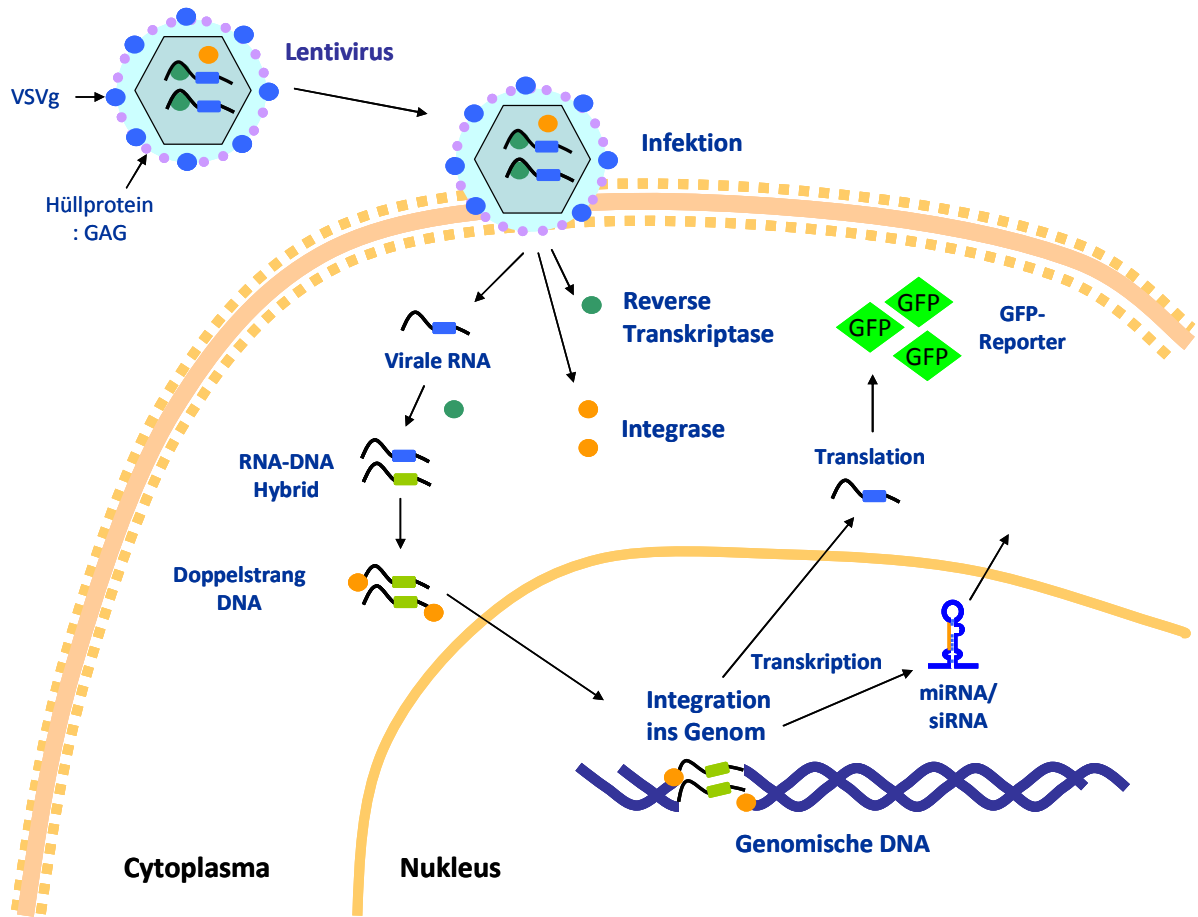


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Mechanismus einer lentiviralen Infektion, der Integration ins Wirtgenom und der Transkription/Translation des integrierten Konstruktes.

2 MATERIAL

2.1 Puffer und Lösungen für SDS- PAGE und Westernblot

Tabelle 1: Blotting Puffer

Substanz	Menge
Tris-HCl	9 g
Glycin	14,6 g
SDS (10%)	18,5 ml
Millipore Wasser	4000 ml
Methanol	ad 5000 ml

Tabelle 2: Elektrophorese Puffer (10-Fach)

Substanz	Menge
Tris-HCl	150 g
Glycin	720 g
SDS	50 g
Millipore Wasser	ad 5000 ml

Tabelle 3: Lämmli Auftragspuffer (5-Fach)

Substanz	Menge
Tris-HCl pH 6,8	60 mM
SDS	2%
Glycerol	24%
2-Mercaptoethanol	14,4 mM
Bromphenolblau	1%

Tabelle 4: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

Substanz	Menge
Tris-Base	30 g
Millipore Wasser	ad 500 ml
pH 6,8 einstellen (mit konz. HCl)	

Tabelle 5: Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

Substanz	Menge
Tris-Base	90,75 g
Millipore Wasser	ad 500 ml
pH 8,8 einstellen (mit konz. HCl)	

Tabelle 6: TBS(10-Fach)

Substanz	Menge
NaCl	400 g
KCl	10 g
Tris-Base	150 g
Millipore Wasser	ad 5000 ml
pH 7,4 einstellen (mit konz. HCl)	

Tabelle 7: Waschpuffer TBST

Substanz	Menge
TBS (10-Fach)	500 ml
50 % Tween 20 (v/v)	10 ml
Millipore Wasser	ad 5000 ml

Tabelle 8: 5 % MLK-TBST:

Substanz	Menge
Magermilchpulver	7,5 g
TBST	150 ml



2.2 Chemikalien

Tabelle 9: Chemikalien

Substanz	Hersteller
[² H ₇] 5-Hydroxypropafenone Hydrochloride	chemische Synthese (Richter et al., 2004)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
4'-Hydroxymephenytoin, [² H ₃] 4'-Hydroxymephenytoin	chemische Synthese (Richter et al., 2004)
Acetaminophen [² H ₄] Acetaminophen	Toronto Research Chemicals, Toronto
Acetonitril LC-MS	Riedel de Haen, Seelze
Acrylamid/Bis (30:0,8)	Bio-Rad, München
Agar	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
Ammoniumacetat	Fluka, Deisenhofen
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Amodiaquin N-Desethylamodiaquin [² H ₅] N-Desethylamodiaquin	Toronto Research Chemicals, Toronto
Ampicilin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Atorvastatin o-/p-Hydroxyatorvastatin [² H ₅] o-/p-Hydroxyatorvastatin	Toronto Research Chemicals, Toronto
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA (bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bupropion hydrochlorid Hydroxybupropion Hydrochlorid [² H ₃] Hydroxybupropion Hydrochlorid	chemische Synthese (Richter et al., 2004)
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs	Eppendorf AG, Hamburg

DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Dulbecco's MEM-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Geneticin (G418)	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma Aldrich, Steinheim
LiChrosolv water for chromatography	Merck, Darmstadt
Magermilch	Fluka, Deisenhofen
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natrium Pyruvat	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Non-Essential Amino Acids 100x	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Nuklease freies Wasser	Ambion, Applera GmbH
Penicillin/Streptomycin (Pen Strep)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Phenacetin	Sigma Aldrich, Steinheim
Polybrene	Millipore, Billerica, USA
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propafenone	Knoll, Ludwigshafen
5-Hydroxypropafenon hydrochloride	
Protein A-Sepharose CL-4B	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Molekulargewichtsmarker (Rainbow)	Amersham, Buckinghamshire, England
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sephadex	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
S-Mephenytoin	Toronto Research Chemicals, Toronto
TEMED	Gibco BRL, Karlsruhe
Tolbutamid Hydroxytolbutamid	Toronto Research Chemicals, Toronto

[²H₉] Hydroxytolbutamid

Tris-Base	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin 0,25 %	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Trypton	Merck, Darmstadt
TurboFect™ <i>in vitro</i> Transfection Reagent	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.3 Verwendete Kits

Tabelle 10: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applera GmbH, Darmstadt
Dual Luciferase Assay	Promega, Madison, USA
Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
JustSpin® Gel Extraction	Genaxxon BioScience, Ulm
Mach1™ T1R Chemically Competent E.coli	Invitrogen, Karlsruhe
mirVana™ Kit	Applera GmbH, Darmstadt
mirVana™ PARIS™ Kit	Applera GmbH, Darmstadt
One Shot® TOP10™ Chemically competent E.coli	Invitrogen, Karlsruhe
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Madison, USA
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applera GmbH, Darmstadt
TaqMan® Multiscribe Reverse Transcription Kit	Applera GmbH, Darmstadt
TaqMan® PreAmp Master Mix	Applera GmbH, Darmstadt
TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG	Applera GmbH, Darmstadt
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
7500 Real-time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
7900 HT Fast Real-time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI 3500XD	Applied Biosystems, Darmstadt
AutoLumat plus	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Autosampler	Agilent Technologies, Waldbronn
Biofuge 22R/ Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Biomark® HD System	Fluidigm, Amsterdam
Elektrophoresekammer SE600 Series	Hoefer, San Francisco
FACS (FACS Calibur)	BD Bioscience, Heidelberg
Fastblot-Apparatur	Biometra, Göttingen
Gerät zur Zellzahlbestimmung Casy1	Innovatis AG, Reutlingen
Heizblock CLF	Laborgeräte, Emersacker
Millipore-Anlage Milli Q	Millipore, Molsheim, Frankreich
Mini PROTEAN Tetra Elektrophorese System	Bio Rad Laboratories GmbH, München-
Mixing Block MB-102	BIOZYM Scientific GmbH, Oldendorf
NanoDrop 2000c	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Novaspec II Spectrophotometer	Pharmacia, Uppsala
ODYSSEY Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg
pH-Meter CG840	Schott, Mainz
Sorvall Superspeed RC2-B	Sorvall Inc/ Hormuth-Vetter, Wiesloch
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
Ultra Optima L-100XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Universal 32	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Universal 320 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Wasserbad Thermostat WB 4MS	Peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen
Wasserbad WTE var 3185	Assistent, Sondheim
Zentrifuge 5414 C	Eppendorf AG, Hamburg

2.5 Laborbedarf

Tabelle 12: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
384 Well Clear Optical Reaction Plate	Applera GmbH, Darmstadt
ABgene® PCR Plates	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn
Einmalküvetten	Sarstedt, Nürnberg
Facs Röhrchen 12x 75mm	Multimed Wicker GmbH, Kirchheim/Teck
Filter 0,45 µm PVDF	Roth, Karlsruhe
Gewebekulturflasche T-75/ T-175	Sarstedt Inc., Newton, USA
Gewebekulturplatte 6/12/24-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen
Nitrozellulose Membran	NeoLab GmbH, Heidelberg
Optical 96/384-Loch Reaction Plate with Barcode	Applera GmbH, Darmstadt
pp-Röhrchen 14 ml	Sarstedt, Nürnberg
Sterilfilter 0,4 µm Porengröße	Schleicher & Schuell, Dassel
Ultra Clear Tubes (25x89 mm)	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
Zellschaber TPP	Trasadingen, Schweiz

2.6 Plasmide, Primer und Antikörper

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-CYP1A2 Antikörper (mAB, mouse, 1:2000) (P2733)	Panvera Madison, USA
Anti-CYP2B6 Antikörper (mAB, mouse, 1:1000) (458326),	BDBiosciences, Heidelberg
Anti-CYP2C9 Antikörper (rAB, rabbit, 1:1000)	RDI-Cyp2C9abr
Anti-CYP2C8 Antikörper (rAB, rabbit, 1:1000) (Hu-A004)	Puracyp, Carlsbad, USA
Anti-CYP3A4 Antikörper (rAB, rabbit, 1:1000) (458234)	BDBiosciences, Heidelberg
Anti-CYP2D6 Antikörper (mAB, mouse, 1:1000)	114 / Uli Zanger
Anti-CAR Antikörper (mAB, mouse, 1:500)	
Anti-HNF4a Antikörper (gAB, mouse, 1:500) (sc-6556)	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-RXRa Antikörper (mAB, mouse, 1:500) (PP-K8508-00)	R&D, Wiesbaden
Anti- β -Aktin Antikörper (mAB, mouse, 1:5000)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Goat anti-mouse IRD800 (1:10000)	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Goat anti-mouse IRD680 (1:10000)	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Goat anti-rabbit IRD800 (1:10000)	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Goat anti-rabbit IRD680 (1:10000)	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
Donkey anti-goat IRD800 (1:10000)	LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA

Tabelle 14: Verwendete Vektoren/ Plasmide

Vektoren	Hersteller
Lentivector-based MicroRNA Precursor Constructs (pCDH-miR143, miR148a und miR27b)	System Biosciences, Mountain View,
miMock	verändert aus pCDHmiR148a (System Biosciences, Mountain View)
Packaging Mix: pLP1, pLP2 und pLP/VSVG	von Dr. Martin Kriebel (NMI Reutlingen)
pCR 4 Blunt-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pLenti C1 und pLenti C2	von Benjamin Kandel (IKP-Stuttgart)
pLenti DF9	von Diana Feidt (IKP-Stuttgart)
pmiRGlo	Promega, Madison, USA
pmirZip-K	System Biosciences, Mountain View
pmiRZip™ Lentivector-based Anti-MicroRNAs (pmiRZip-miR143, miR148a und miR27b)	System Biosciences, Mountain View,

Tabelle 15: Verwendete Primer

Pimer (Metabion)	Sequenz (5'-3')
CYP2C8 3'UTR for PmeI	gtttaaacGAAGAATGCTAGCCCATCTGGC
CYP2C8 total rev XhoI	ctcgagTGAACCAGCAATTAATAACAC
CYP3A4 3'UTR for	GCAGATCCCCCTGAAATTAAG
CYP3A4 rev	TAGGCTTATTGCTCAATCAATTG
pmir-GLO seq for	TGACCGGCAAGTTGGACGCC
pmir-GLO seq rev	GGTGGCAGCAGCCAACCTCAG
pMIRNA1 EF1 seq rev	GCACCCGTTCAATTGCCG

2.7 TaqMan® Primer und Probe

2.7.1 TaqMan® microRNA Assays

Tabelle 16: microRNA Assays auf den TaqMan® Micro Fluid Cards und für Einzel- oder Fluidigm, Biomark Messungen (fett) von der Firma Applera GmbH, Darmstadt

microRNA	Bestell- nummer	microRNA	Bestell- nummer	microRNA	Bestell- nummer
ath-miR159a	4373390	hsa-miR-134	4373299	hsa-miR-184	4373113
has-miR-155	4395459	hsa-miR-135a	4373140	hsa-miR-185	4395382
hsa-let-7a	4373169	hsa-miR-135b	4395372	hsa-miR-186	4395396
hsa-let-7b	4395446	hsa-miR-136	4373173	hsa-miR-187	4373307
hsa-let-7c	4373167	hsa-miR-137	4373301	hsa-miR-188-3p	4395217
hsa-let-7d	4395394	hsa-miR-138	4395395	hsa-miR-18a	4395533
hsa-let-7e	4395517	hsa-miR-139-3p	4395424	hsa-miR-18b	4395328
hsa-let-7f	4373164	hsa-miR-139-5p	4395400	hsa-miR-190	4373110
hsa-let-7g	4395393	hsa-miR-140-3p	4395345	hsa-miR-191	4395410
hsa-miR-1	4395333	hsa-miR-140-5p	4373374	hsa-miR-192	4373108
hsa-miR-100	4373160	hsa-miR-141	4373137	hsa-miR-193a-3p	4395361
hsa-miR-101	4395364	hsa-miR-142-3p	4373136	hsa-miR-193a-5p	4395392
hsa-miR-103	4373158	hsa-miR-142-5p	4395359	hsa-miR-193b	4395478
hsa-miR-105	4395278	hsa-miR-143	4395360	hsa-miR-194	4373106
hsa-miR-106a	4395280	hsa-miR-145	4395389	hsa-miR-195	4373105
hsa-miR-106b	4373155	hsa-miR-146a	4373132	hsa-miR-196b	4395326
hsa-miR-107	4373154	hsa-miR-146b-3p	4395472	hsa-miR-197	4373102
hsa-miR-10a	4373153	hsa-miR-146b-5p	4373178	hsa-miR-198	4395384
hsa-miR-10b	4395329	hsa-miR-147	4373131	hsa-miR-199a-3p	4395415
hsa-miR-122	4395356	hsa-miR-147b	4395373	hsa-miR-199a-5p	4373272
hsa-miR-124	4373295	hsa-miR-148a	4373130	hsa-miR-199b-5p	4373100
hsa-miR-125a-3p	4395310	hsa-miR-148b	4373129	hsa-miR-19a	4373099
hsa-miR-125a-5p	4395309	hsa-miR-149	4395366	hsa-miR-19b	4373098
hsa-miR-125b	4373148	hsa-miR-150	4373127	hsa-miR-200a	4378069
hsa-miR-126	4395339	hsa-miR-152	4395170	hsa-miR-200b	4395362
hsa-miR-127-3p	4373147	hsa-miR-153	4373305	hsa-miR-200c	4395411
hsa-miR-127-5p	4395340	hsa-miR-154	4373270	hsa-miR-202	4395474
hsa-miR-128	4395327	hsa-miR-15a	4373123	hsa-miR-203	4373095
hsa-miR-129-3p	4373297	hsa-miR-15b	4373122	hsa-miR-204	4373094
hsa-miR-129-5p	4373171	hsa-miR-16	4373121	hsa-miR-205	4373093
hsa-miR-130a	4373145	hsa-miR-17	4395419	hsa-miR-208	4373091
hsa-miR-130b	4373144	hsa-miR-181a	4373117	hsa-miR-208b	4395401
hsa-miR-132	4373143	hsa-miR-181c	4373115	hsa-miR-20a	4373286
hsa-miR-133a	4395357	hsa-miR-182	4395445	hsa-miR-20b	4373263
hsa-miR-133b	4395358	hsa-miR-183	4395380	hsa-miR-21	4373090
RNU44	4373384	RNU48	4373383		

microRNA	Bestell- nummer	microRNA	Bestell- nummer	microRNA	Bestell- nummer
hsa-miR-210	4373089	hsa-miR-31	4395390	hsa-miR-377	4373025
hsa-miR-211	4373088	hsa-miR-32	4395220	hsa-miR-379	4373349
hsa-miR-212	4373087	hsa-miR-320	4395388	hsa-miR-380	4373022
hsa-miR-214	4395417	hsa-miR-323-3p	4395338	hsa-miR-381	4373020
hsa-miR-215	4373084	hsa-miR-324-3p	4395272	hsa-miR-382	4373019
hsa-miR-216a	4395331	hsa-miR-324-5p	4373052	hsa-miR-383	4373018
hsa-miR-216b	4395437	hsa-miR-325	4373051	hsa-miR-384	4373017
hsa-miR-217	4395448	hsa-miR-326	4373050	hsa-miR-409-5p	4395442
hsa-miR-218	4373081	hsa-miR-328	4373049	hsa-miR-410	4378093
hsa-miR-219-1-3p	4395206	hsa-miR-329	4373191	hsa-miR-411	4381013
hsa-miR-219-2-3p	4395501	hsa-miR-330-3p	4373047	hsa-miR-412	4373199
hsa-miR-219-5p	4373080	hsa-miR-330-5p	4395341	hsa-miR-422a	4395408
hsa-miR-22	4373079	hsa-miR-331-3p	4373046	hsa-miR-423-5p	4395451
hsa-miR-220	4373078	hsa-miR-331-5p	4395344	hsa-miR-424	4373201
hsa-miR-220b	4395317	hsa-miR-335	4373045	hsa-miR-425	4380926
hsa-miR-220c	4395322	hsa-miR-337-5p	4395267	hsa-miR-429	4373203
hsa-miR-221	4373077	hsa-miR-338-3p	4395363	hsa-miR-431	4395173
hsa-miR-222	4395387	hsa-miR-339-3p	4395295	hsa-miR-433	4373205
hsa-miR-223	4395406	hsa-miR-339-5p	4395368	hsa-miR-448	4373206
hsa-miR-224	4395210	hsa-miR-33b	4395196	hsa-miR-449a	4373207
hsa-miR-23a	4373074	hsa-miR-340	4395369	hsa-miR-449b	4381011
hsa-miR-23b	4373073	hsa-miR-342-3p	4395371	hsa-miR-450a	4395414
hsa-miR-24	4373072	hsa-miR-342-5p	4395258	hsa-miR-450b-3p	4395319
hsa-miR-25	4373071	hsa-miR-345	4395297	hsa-miR-450b-5p	4395318
hsa-miR-26a	4395166	hsa-miR-346	4373038	hsa-miR-451	4373360
hsa-miR-26b	4395167	hsa-miR-34a	4395168	hsa-miR-452	4395440
hsa-miR-27a	4373287	hsa-miR-34c-5p	4373036	hsa-miR-453	4395429
hsa-miR-27b	4373068	hsa-miR-361-5p	4373035	hsa-miR-454	4395434
hsa-miR-28-3p	4395557	hsa-miR-362-3p	4395228	hsa-miR-455-3p	4395355
hsa-miR-28-5p	4373067	hsa-miR-362-5p	4378092	hsa-miR-455-5p	4378098
hsa-miR-296-3p	4395212	hsa-miR-363	4378090	hsa-miR-483-5p	4395449
hsa-miR-296-5p	4373066	hsa-miR-365	4373194	hsa-miR-484	4381032
hsa-miR-298	4395301	hsa-miR-367	4373034	hsa-miR-485-3p	4378095
hsa-miR-299-3p	4373189	hsa-miR-369-3p	4373032	hsa-miR-485-5p	4373212
hsa-miR-299-5p	4373188	hsa-miR-369-5p	4373195	hsa-miR-486-3p	4395204
hsa-miR-29a	4395223	hsa-miR-370	4395386	hsa-miR-486-5p	4378096
hsa-miR-29b	4373288	hsa-miR-371-3p	4395235	hsa-miR-487a	4378097
hsa-miR-29c	4395171	hsa-miR-372	4373029	hsa-miR-487b	4378102
hsa-miR-301a	4373064	hsa-miR-373	4378073	hsa-miR-488	4395468
hsa-miR-301b	4395503	hsa-miR-374a	4373028	hsa-miR-489	4395469
hsa-miR-302a	4378070	hsa-miR-374b	4381045	hsa-miR-490-3p	4373215
hsa-miR-302b	4378071	hsa-miR-375	4373027	hsa-miR-491-3p	4395471
hsa-miR-302c	4378072	hsa-miR-376a	4373026	hsa-miR-491-5p	4381053
hsa-miR-30b	4373290	hsa-miR-376b	4373196	hsa-miR-492	4373217
hsa-miR-30c	4373060	hsa-miR-376c	4395233	hsa-miR-493	4395475

microRNA	Bestell- nummer	microRNA	Bestell- nummer	microRNA	Bestell- nummer
hsa-miR-494	4395476	hsa-miR-520d-5p	4395504	hsa-miR-624	4395541
hsa-miR-495	4381078	hsa-miR-520e	4373255	hsa-miR-625	4395542
hsa-miR-496	4386771	hsa-miR-520f	4373256	hsa-miR-627	4380967
hsa-miR-499-3p	4395538	hsa-miR-520g	4373257	hsa-miR-628-5p	4395544
hsa-miR-499-5p	4381047	hsa-miR-521	4373259	hsa-miR-629	4395547
hsa-miR-500	4395539	hsa-miR-522	4395524	hsa-miR-636	4395199
hsa-miR-501-3p	4395546	hsa-miR-523	4395497	hsa-miR-642	4380995
hsa-miR-501-5p	4373226	hsa-miR-524-5p	4395174	hsa-miR-651	4381007
hsa-miR-502-3p	4395194	hsa-miR-525-3p	4395496	hsa-miR-652	4395463
hsa-miR-502-5p	4373227	hsa-miR-525-5p	4378088	hsa-miR-653	4395403
hsa-miR-503	4373228	hsa-miR-526b	4395493	hsa-miR-654-3p	4395350
hsa-miR-504	4395195	hsa-miR-532-3p	4395466	hsa-miR-654-5p	4381014
hsa-miR-505	4395200	hsa-miR-532-5p	4380928	hsa-miR-655	4381015
hsa-miR-506	4373231	hsa-miR-539	4378103	hsa-miR-660	4380925
hsa-miR-507	4373232	hsa-miR-541	4395312	hsa-miR-671-3p	4395433
hsa-miR-508-3p	4373233	hsa-miR-542-3p	4378101	hsa-miR-672	4395438
hsa-miR-508-5p	4395203	hsa-miR-542-5p	4395351	hsa-miR-674	4395193
hsa-miR-509-3-5p	4395266	hsa-miR-544	4395376	hsa-miR-708	4395452
hsa-miR-509-5p	4395346	hsa-miR-545	4395378	hsa-miR-744	4395435
hsa-miR-510	4395352	hsa-miR-548a-3p	4380948	hsa-miR-758	4395180
hsa-miR-511	4373236	hsa-miR-548a-5p	4395523	hsa-miR-871	4395465
hsa-miR-512-3p	4381034	hsa-miR-548b-3p	4380951	hsa-miR-872	4395375
hsa-miR-512-5p	4373238	hsa-miR-548b-5p	4395519	hsa-miR-873	4395467
hsa-miR-513-5p	4395201	hsa-miR-548c-3p	4380993	hsa-miR-874	4395379
hsa-miR-515-3p	4395480	hsa-miR-548c-5p	4395540	hsa-miR-875-3p	4395315
hsa-miR-515-5p	4373242	hsa-miR-548d-3p	4381008	hsa-miR-876-3p	4395336
hsa-miR-516a-5p	4395527	hsa-miR-548d-5p	4395348	hsa-miR-876-5p	4395316
hsa-miR-516b	4395172	hsa-miR-551b	4380945	hsa-miR-885-3p	4395483
hsa-miR-517a	4395513	hsa-miR-556-3p	4395456	hsa-miR-885-5p	4395407
hsa-miR-517b	4373244	hsa-miR-556-5p	4395455	hsa-miR-886-3p	4395305
hsa-miR-517c	4373264	hsa-miR-561	4380938	hsa-miR-886-5p	4395304
hsa-miR-518a-3p	4395508	hsa-miR-570	4395458	hsa-miR-887	4395485
hsa-miR-518a-5p	4395507	hsa-miR-574-3p	4395460	hsa-miR-888	4395323
hsa-miR-518b	4373246	hsa-miR-576-3p	4395462	hsa-miR-889	4395313
hsa-miR-518c	4395512	hsa-miR-576-5p	4395461	hsa-miR-890	4395320
hsa-miR-518d-3p	4373248	hsa-miR-579	4395509	hsa-miR-891a	4395302
hsa-miR-518d-5p	4395500	hsa-miR-582-3p	4395510	hsa-miR-891b	4395321
hsa-miR-518e	4395506	hsa-miR-582-5p	4395175	hsa-miR-892a	4395306
hsa-miR-518f	4395499	hsa-miR-589	4395520	hsa-miR-9	4373285
hsa-miR-519a	4395526	hsa-miR-590-5p	4395176	hsa-miR-92a	4395169
hsa-miR-519c-3p	4373251	hsa-miR-597	4380960	hsa-miR-93	4373302
hsa-miR-519d	4395514	hsa-miR-598	4395179	hsa-miR-95	4373011
hsa-miR-519e	4395481	hsa-miR-615-3p	4386777	hsa-miR-96	4373372
hsa-miR-520a-3p	4373268	hsa-miR-615-5p	4395464	hsa-miR-98	4373009
hsa-miR-520a-5p	4378085	hsa-miR-616	4395525	hsa-miR-99a	4373008
hsa-miR-520b	4373252	hsa-miR-618	4380996	hsa-miR-99b	4373007

2.7.2 TaqMan® mRNA Assays (ADME Array)

Tabelle 17: Auswahl von 48 TaqMan® Assays aus dem Bereich der ADME Gene zur Erstellung einer TaqMan® Array Micro Fluid Card (ADME Array)

Gen	Bestellnummer	Hersteller
18S	Hs99999901_s1	Applera GmbH, Darmstadt
ABCB1	Hs01067802_m1	Applera GmbH, Darmstadt
ABCC2	Hs00166123_m1	Applera GmbH, Darmstadt
AHR	Hs00169233_m1	Applera GmbH, Darmstadt
AHRR	Hs00324967_m1	Applera GmbH, Darmstadt
ARNT	Hs01121918_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CREBBP	Hs00231733_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP1A1	Hs00153120_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP1A2	Hs01070374_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP1B1	Hs00164383_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2A6	Hs00868409_s1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2B6	Hs03044634_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2C18	Hs00426400_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2C19	Hs00426380_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2C8	Hs00258314_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2C9	Hs00426397_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2D6	Hs00164385_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP2E1	Hs00559367_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP3A4	Hs00430021_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP3A5	Hs01070905_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP3A7	Hs00426361_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP4F2	Hs00426608_m1	Applera GmbH, Darmstadt
CYP7A1	Hs00167982_m1	Applera GmbH, Darmstadt
DPYD	Hs00559279_m1	Applera GmbH, Darmstadt
FOXO1	Hs00231106_m1	Applera GmbH, Darmstadt
GAPDH	Hs99999905_m1	Applera GmbH, Darmstadt
HMGCR	Hs00168352_m1	Applera GmbH, Darmstadt
HNF1A	Hs00167041_m1	Applera GmbH, Darmstadt
HNF4A	Hs01023298_m1	Applera GmbH, Darmstadt
INSIG1	Hs01650977_g1	Applera GmbH, Darmstadt
INSIG2	Hs00379223_m1	Applera GmbH, Darmstadt
NROB2	Hs00222677_m1	Applera GmbH, Darmstadt
NR1H3	Hs00172885_m1	Applera GmbH, Darmstadt
NR1H4	Hs00231968_m1	Applera GmbH, Darmstadt
NR1I2	Hs00243666_m1	Applera GmbH, Darmstadt
NR1I3	Hs00901571_m1	Applera GmbH, Darmstadt
NR3C1	Hs00230818_m1	Applera GmbH, Darmstadt
POR	Hs00287016_m1	Applera GmbH, Darmstadt
PPARA	Hs00231882_m1	Applera GmbH, Darmstadt
RPLP0	Hs99999902_m1	Applera GmbH, Darmstadt
RXRA	Hs00172565_m1	Applera GmbH, Darmstadt
SLC10A1	Hs00161820_m1	Applera GmbH, Darmstadt
SLC22A7	Hs00198527_m1	Applera GmbH, Darmstadt

SLCO1B1	Hs00272374_m1	Applera GmbH, Darmstadt
SREBF1	Hs00231674_m1	Applera GmbH, Darmstadt
SREBF2	Hs00190237_m1	Applera GmbH, Darmstadt
UGT1A1	Hs02511055_s1	Applera GmbH, Darmstadt
VDR	Hs01045840_m1	Applera GmbH, Darmstadt

2.8 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.8.1 Zelllinien

Tabelle 18: Verwendete Zelllinien/ primäre Zellen

Zelllinie/Herkunft	Beschreibung
HepG2 (ATCC)	immortalisierte zelluläre Leberkarzinomzellen eines männlichen, 15 Jahre alten Kaukasiers
HEK293 (ATCC)	adhärent wachsende menschliche embryonale Nierenzellen. Sie exprimieren wenig leberspezifische Gene, sind leicht zu transfizieren und wurden für Reporter-gen-Assays verwendet.
HEK293 FT (Invitrogen)	stammen von HEK293 Zellen ab, exprimieren „SV40 large T-Antigen“ und ermöglichen die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden, die das „SV40 origin of replication“ tragen. Sie sind „schnell wachsend“ (fast growing;F) und wurden als Wirt zur Produktion von lentiviralen Partikeln verwendet
HT1080	sind humane Fibrosarkomzellen von einem 35 Jahre alten männlichen Kaukasier. Diese Zellen wurden zur Titerbestimmung lentiviraler Partikel verwendet.
Primäre humane Hepatozyten	isolierte Hepatozyten aus frischem operativ entfernten Lebergewebe von verschiedenen Donoren (siehe Protokoll im Anhang). Isoliert und bereitgestellt von den Universitätskliniken in Berlin (Charite, Humboldt Universität), München (Ludwig-Maximilian-Universität) und Regensburg (Universität Regensburg).

Tabelle 19: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

HepG2 und HEK293		
	DMEM	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	1 mM Natrium-Pyruvat	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	10 % Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
	1 % Penicillin und Streptomycin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
293FT und HT1080:		
	DMEM	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	1 mM Natrium-Pyruvat	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	10 % Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
	1 % Penicillin und Streptomycin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	2mM L-Glutamin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	1x nicht essentielle Aminosäuren	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	500 µg/ml G418	Merck, Darmstadt
Hepatozyten		
	Williams E	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	1 mM Natrium-Pyruvat	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	10 % Fötale Kälberserum	Sigma-Aldrich, Steinheim
	1 % Penicillin und Streptomycin	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
	0,1 % DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
	40 I.E Insulin	
	0,1 µM Dexamethason	

2.9 Software

Tabelle 20: Verwendete Software und Webseiten

Produkt	Hersteller
Berthold Tubemaster	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Biomark Data Analysis	Fluidigm, Amsterdam
Geneious Pro 4.8.4	www.geneious.com
Genomatix	http://www.genomatix.de/cgi-bin/sessions
microCosm	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/
miRBase	http://www.mirbase.org/
miRDB	http://mirdb.org/miRDB/
miRTarbase	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Office 2003	Microsoft
Patrocles	http://www.patrocles.org/
Prism 5.0	GraphPad Software Inc. www.graphpad.com
SDS Software v2.1	Applera GmbH, Darmstadt
Software R v2.11.1	The R Project for Statistical Computing 2011
TargetScan	http://www.targetscan.org/vert_50/
Visual Basic Studio	Microsoft

3 METHODEN

3.1 *In silico* Methoden

3.1.1 Entwicklung des MIRNA-DISTILLER

Der MIRNA-DISTILLER wurde zur Analyse von Vorhersagen für miRNA Bindestellen in einem größeren Genset entwickelt. Die Programmierung des Programms wurde von Denis A. Bodan (Softwareentwickler) übernommen und durchgeführt. Die Idee, das Design, die Applikations-Vorgänge, die Grundlagen für die Programmierung und das Testverfahren wurden von mir durchgeführt. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit nicht auf die Programmierung, sondern in erster Linie auf die Anwendung und die Funktionen des Programms eingegangen (siehe 4.1).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Klonierung

Zur Klonierung von Reporter-genvektoren wurde das TOPO TA Kit von Invitrogen verwendet. Es wurden zunächst Primer entworfen mit denen es möglich war, die vollständige 3'UTR eines Gens zu amplifizieren. Dafür war es notwendig auf die Homologie der zu verwendenden Regionen zu achten, um möglichst spezifische PCR Produkte zu erhalten. 250 ng genomische DNA wurde als Template für die PCR verwendet. Des Weiteren wurden 5 mM dNTPs, je 50 pmol forward und reverse Primer, 0,25 µl Expand High Fidelity (Roche) Polymerase und den dazu gehörigen Puffer auf 25 µl mit nukleasefreiem Wasser aufgefüllt und mit folgendem Programm im PCR Cyclor amplifiziert:

1 Zyklus	95°C	2 min
25 Zyklen	95°C	30 s
	54-60°C	1 min (je nach Primer Schmelztemperatur)
	72°C	1 min
1 Zyklus	72°C	5 min
	4°C	halten

Anschließend wurden die PCR Produkte mit einem Auftragspuffer versetzt und in die Taschen eines Agarosegels geladen. Die Proben wurden bei ca. 80-120 Volt im Gel getrennt. Nach ca. 30 min wurden die Banden auf dem Gel mit UV sichtbar gemacht und ggf. fotografiert. Banden des gewünschten Molekulargewichts wurden ausgeschnitten und in JustSpin Röhrchen (Genaxxon) überführt. Nach einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 8000 g wurde das eluierte Fragment in pcDNA 4 ligiert. Nach der Transformation in TOP10 Zellen und dem Ausplattieren auf LB-Ampicillin Agarplatten, wurden diese über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die gewachsenen Kolonien mit einem Holzstäbchen aufgenommen und als Linie auf eine selektive Masterplatte ausgestrichen. Nach sechsstündiger Inkubation bei 37°C wurden einzelne Klone in 2ml flüssigem LB-Ampicillin Medium in einem Schraubdeckelröhrchen angeimpft und über Nacht bei leichtem Schütteln und 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Bakteriensuspension in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt, bei 10000 g 10 min zentrifugiert und die Plasmid DNA isoliert (3.2.2).

3.2.2 Plasmidpräparation (Mini Präp)

Die Plasmidpräparation wurde analog zu den Herstellerangaben des QIAGEN Mini-Prep Kits durchgeführt. Die Plasmidkonzentration wurde mit dem NanoDrop (PeqLab) photometrisch bei 260 nm ermittelt. Die aufgereinigten Plasmide wurden zunächst für die Sequenzierung und anschließend für einen präparativen Verdau für die weitere Klonierung in einem Reportervektor verwendet.

3.2.3 Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion wurde mit spezifischen Primern für die zu sequenzierenden Plasmide angesetzt. Zur Sequenzierung eines TOPO TA Vektor Klons wurden die im Kit mitgelieferten M13 Sequenzierprimer eingesetzt. Für den Reportervektor wurde spezielle, für den Vektor entworfene Primer verwendet. Der Sequenzieransatz wurde mit dem BigDye Terminator Mix v3.1 Kit von Applied Biosystems GmbH angesetzt.



Sequenzieransatz:

200-300 ng Plasmid DNA
 1 µl 5x Sequenzierpuffer
 2 µl BigDye Terminator Mix v3.1
 3,2 pmol seq. Primer (siehe Tab. 15)
 ad 10 µl HPLC Wasser

Die Reaktion wurde im PCR Cycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 Zyklus	95°C	1 min
25 Zyklen	95°C	10 s
	50-55°C	10 s
	60°C	3,5 min
1 Zyklus	12°C	halten

Anschließend wurden die Proben auf eine mit 250 µl Sephadex gefüllte Filterspitze pipettiert und bei 3000 g 2 min zentrifugiert und so aufgereinigt. Das Eluat wurde 1:4 mit HPLC Wasser verdünnt und 20 µl der Verdünnung wurde für die Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software Genius durchgeführt.

3.2.4 Luciferase Reportergeren Konstrukte

Als Reportervektor wurde der pmirGLO Vektor (Abb. 5) verwendet. Er besitzt zwei Luciferase Reporter, einen variablen (Firefly Luciferase), der vor der zu inserierenden 3'UTR liegt und einen konstitutiv exprimierten (Renilla Luciferase), der zur Normierung verwendet werden kann. Der pmirGLO Vektor besitzt einen PGK Promotor, welcher eine schwächere Expression der zu überprüfenden Sequenz zur Folge hat. Dies ermöglicht eine Herunterregulierung der zu überprüfenden Sequenz auch mit geringer microRNA Konzentration. Zudem ist er für die Anwendung zur Überprüfung von microRNA Zielsequenzen optimiert.

Um die Zielsequenzen in die Vektoren einzufügen, wurde sowohl der Zielvektor (pmiRGLO) als auch das aus dem pcDNA 4 Vektor stammende Insert mit derselben

Endonukleasenkombination verdaut. Für die CYP2C8 3'UTR Sequenz wurden die Enzyme *PmeI* und *XhoI* und für die CYP3A4 3'UTR *PmeI* und *NotI* verwendet. Der Verdau wurde mindestens 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt.

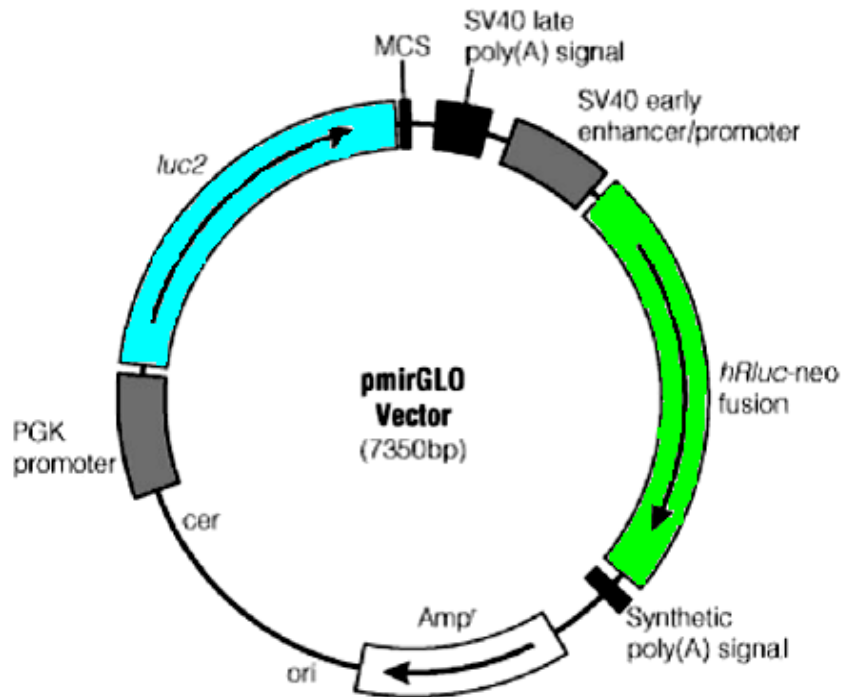


Abbildung 5: Verwendeter Reporter Vektor pmirGLO von Promega.

Das Insertfragment und der Donorvektor wurden jeweils ausgeschnitten und wie oben in den JustSpin Röhrchen zentrifugiert. Aus den erhaltenen Eluaten wurde dann in einem Verhältnis 1:3 von Vektor zu Insert (in 12 µl) vereinigt und mit je 1,5 µl T4 Ligase und Ligase Puffer versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und am darauf folgenden Tag in TOP10 Zellen transformiert. Anschließend wurde wie unter 3.2.1 beschrieben fortgefahren. Das nach der Plasmidpräparation erhaltene Plasmid wurde mit einem Kontrollverdau überprüft und anschließend zur Transfektion in HEK293 Zellen verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford mit dem Bio-Rad Reagenz. Dafür wurde eine Eichreihe von 1,44 – 5,76 µg mit BSA erstellt und anschließend die gemessenen Proben Mittels linearer Regressionsanalyse berechnet. Dafür wurde ein Probenvolumen von 800 µl angesetzt, welches aus einer definierten Menge an zu messender Probe und Milliporwasser bestand mit 200 µl Bio-Rad Reagenz versetzt und sofort gemischt. Der Ansatz wurden für 10 bis 20 min inkubiert und anschließend die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm ermittelt.

3.3.2 Durchführung einer SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

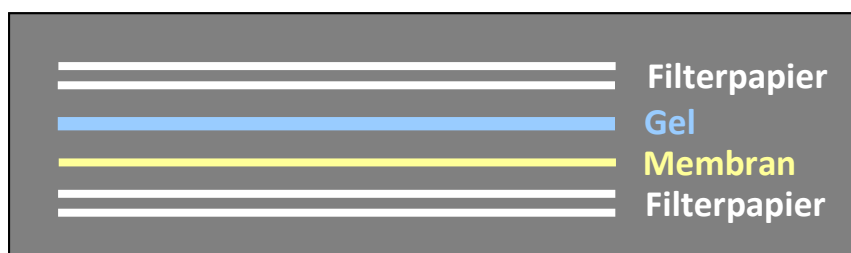
Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer relativen Molekülmasse wurde eine denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden die Proben zunächst mit Lämmli Puffer versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Aufgrund des anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) im Lämmli Puffer und im Gel selbst, erhalten die Proteine ein identisches Verhältnis negativer Ladung zur Masse. Somit ist eine Auftrennung der Proteine relativ zur Masse im elektrischen Feld möglich. Zur Herstellung des Trenngels wurden benötigte Komponenten (siehe Tab. 21) vereinigt und zwischen zwei durch 1,5 mm dicke Abstandhalter getrennte Glasplatten eines Gelsystems der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach mindestens 20 min ist die Auspolymerisierung des Trenngels abgeschlossen und kann nach gründlicher Entfernung des Isopropanols mit dem vorbereiteten Sammelgel überschichtet werden, in welches der Kamm zur Ausbildung von Geltaschen für die Probenauftragung, gesteckt wurde. Nach etwa 30 min wurde das Gel in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoreseapparatur gestellt, der Kamm vorsichtig herausgezogen, die Taschen mit Puffer ausgewaschen und die Proben aufgetragen. Zur Abschätzung der Proteingröße wurde der Proteingrößenmarker Rainbow (Amersham) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei maximal 130 V.

Tabelle 21: SDS-Gel Pipettierschema für vier kleine Gele oder 1 großes Gel

Lösungen	10 % SDS- Trenngel	4 % Sammelgel
Millipore Wasser	9,95 ml	6,1 ml
Tris pH 8,8	6,22 ml	-
Tris pH 6,8	-	2,5ml
Acrylamid	8,3 ml	1,35 ml
SDS	250 µl	100 µl
TEMED	25 µl	10 µl
10 % APS	250 µl	100 µl

3.3.3 Proteintransfer

Um die Proteine, die durch die SDS-PAGE getrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren wurde „semidry“ geblottet. Dafür wurde das Fastblot Gerät von Biometra verwendet. Benötigt wurden dafür vier Blottingpapiere, eine Nitrozellulosemembran und das unter 3.2.2 beschriebene SDS-Gel. Alles wurde für ca. 10 min in Blottingpuffer getränkt und anschließend auf die Blottingapparatur gelegt (siehe Abb. 6). Der Transfer wurde 15 min bei einer Stromstärke von 1-3 mA pro cm² durchgeführt. Zur Überprüfung der Blot-Effizienz wurde die Nitrozellulosemembran mit einer Ponceau S Lösung 5 min angefärbt und dokumentiert

**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Blotting Aufbaus**

3.3.4 Immunoblot

Die mit Ponceau S gefärbte Membran (siehe 3.3.3) wurde ca. 5 min mit TBST entfärbt und anschließend mit 5% MLK-TBST für 1 h bei RT blockiert. Die geblockte Membran wurde dann zwischen 1 und 2 Std. bei RT oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln mit einer Primärantikörperlösung (1% MLK-TBST) inkubiert. Dann wurde die Membran gründlich gewaschen, indem sie je drei Mal 1 min und 10 Minuten in TBST geschüttelt wurde. Anschließend wurde die Membran mit einem speziesspezifischen fluoreszenzmarkierten sekundär Antikörper (Licor 1:10000 in 1% MLK-TBST) für 30-60 min inkubiert und erneut wie oben beschrieben gewaschen. Zur Detektion wurde der Odyssey Infrared Imager (Licor) verwendet.



3.4 Zellkultur Methoden

3.4.1 Kultivierung der Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Anteil im jeweils zugehörigen Medium (Tab. 19) kultiviert. Da es sich bei allen Zelltypen um adhärenz Zellen handelte wurden Kollagen beschichtete Zellkulturflaschen (T75; T175, Sarstedt) zur Kultivierung eingesetzt. Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten, wurden sie passagiert.

3.4.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit dem Casy Zellzählgerät bestimmt. Dafür wurden 50 µl der Zellsuspension nach dem Trypsinieren abgenommen, mit 10 ml Casyton verdünnt und gemessen. Die Messparameter wurden je nach Zelltyp und Konzentration nach den Empfehlungen des Herstellers eingestellt.

3.4.3 Kotransfektion für Reporter-Gen-Assays in HEK293 Zellen

Für Kotransfektionen wurden zunächst die pmirGLO Plasmide mit den microRNA Expressionsvektoren pCDH bzw. pmirZip (System Biosciences) gemischt. Es wurden 200 ng pmirGLO-Vektor und 500 bzw. 800 ng der pCDH bzw. pmirZip Vektoren eingesetzt und wenn notwendig mit einem Leervektor aufgefüllt (miMock bzw. miRZip K), um eine Menge von 1 µg DNA pro Transfektionsansatz zu erhalten. Der DNA-Mix wurde dann mit DMEM-Medium ohne Zusätze auf 98 µl aufgefüllt. Anschließend wurden zu jedem dieser Ansätze 2 µl des Transfektionsreagenz TurboFect (Fermentas) gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Zu den frisch ausgesäten HEK293 Zellen (1x10⁵ pro Ansatz im 24 Loch Format) wurden je 100 µl des Ansatzes gegeben und die transfizierten Zellen anschließend bis zur Lyse 48 Stunden bei 37°C kultiviert. Die Transfektionen wurde in Triplikaten durchgeführt.



3.4.4 Luciferase Assay

Die unter 3.4.3 transfizierten Zellen wurden mit dem im Promega Dual-Luciferase Assay enthaltenen passiven Lysepuffer, wie es die Herstellerangaben vorschreiben, lysiert. Anschließend wurden 40 µl des Lysats in Reagenzröhrchen pipettiert und im Autolumat analysiert. Die Substrate für die Renilla und die Firefly Luciferase wurden automatisch von dem Gerät injiziert und die Luminiszenz gemessen. Die Daten wurden dann jeweils auf die interne Kontrolle normiert. Durch Bindung der kotransfizierten microRNA an die im Reporter enthaltene 3'UTR (siehe Abb. 7) wird eine verminderte Produktion der Reporterluciferase und demzufolge eine verminderte Luminiszenz erwartet. Damit kann im Bezug auf eine Kontrolle ermittelt werden, ob eine direkte Bindung an die Zielsequenz stattgefunden hat.

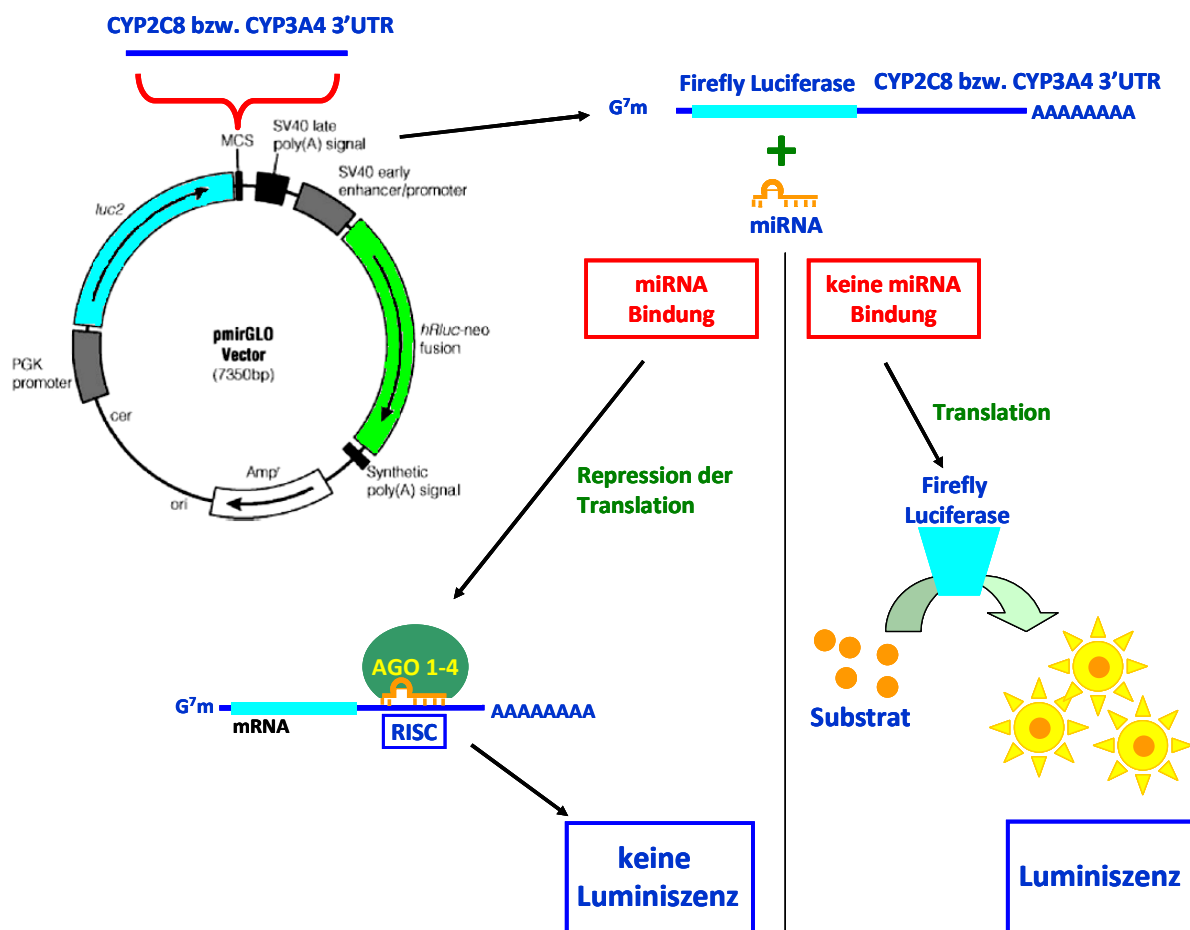


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mechanismus des Reportergen Assays.

Virusexperimente (S2-Arbeiten)

Die nachfolgenden Methoden wurden alle im S2-Labor des IKP-Stuttgarts unter den geltenden Richtlinien und Sicherheitsmaßnahmen beim Umgang mit Organismen der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt.

3.4.5 Virusproduktion

Die Virusproduktion wurde standardisiert nach der selbst mitentwickelten SOP durchgeführt. Zur Produktion von lentiviralen Partikeln wurden zunächst zwei Ansätze zur Transfektion von HEK293FT Zellen gemacht (siehe Abb. 8).

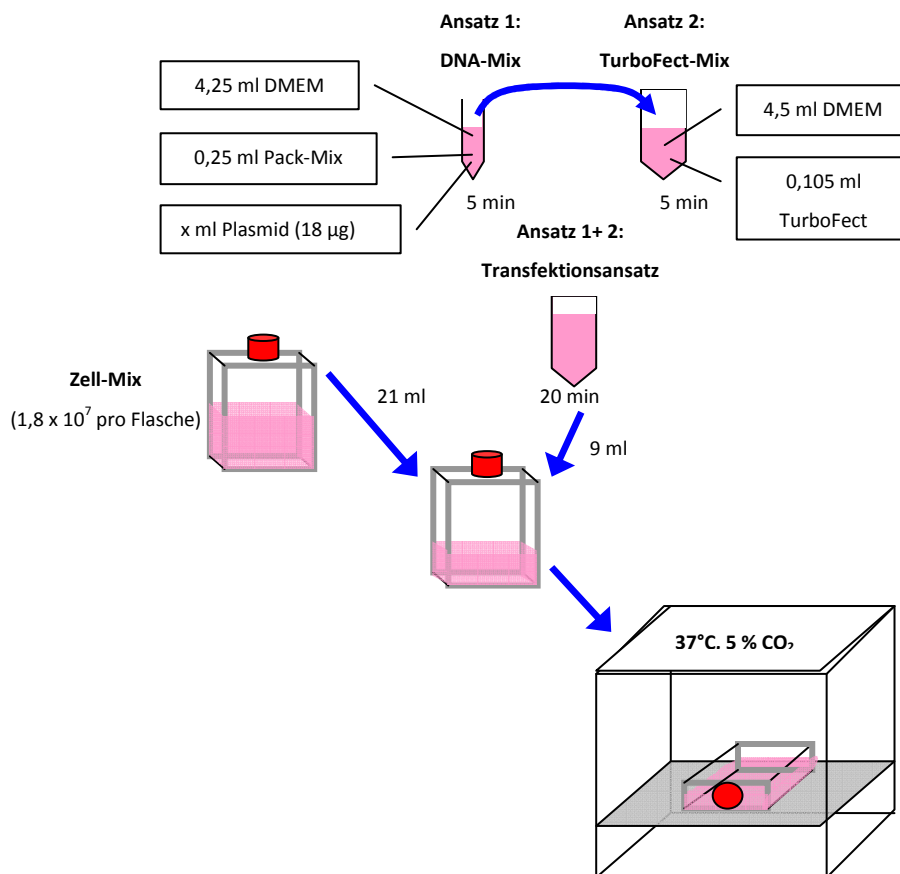


Abbildung 8: Schematischer Ablauf der Transfektion der Plasmide für die Produktion von Viruspartikeln.

Für den DNA-Mix, wurden 18 µg des Expressionsvektors für eine miRNA oder shRNA und 25 µg des Packaging-Mix, der aus drei Plasmiden besteht (pLP1, pLP2 und pLP/VSVG), die für spezifische Virusproteine kodieren, in einem Gesamtvolumen von 4,5 ml DMEM Medium ohne Zusätze, vermischt. Ein zweiter Ansatz enthielt die korrespondierende Menge (105 µl) des Transfektionsreagenzes TurboFect (Fermentas) in 4,5 ml DMEM. Anschließend wurden die beiden Ansätze vereinigt, gemischt und 20 min inkubiert. Dieser Transfektionsansatz wurde dann direkt zu der Suspension aus $1,8 \times 10^7$ HEK293FT Zellen in 21 ml DMEM Medium mit Zusätzen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden dann 48h ohne Mediumswechsel bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach 48h wurde von den Zellen der Überstand (30 ml) abgenommen und bei 1750 x g bei 4° für 5 min zentrifugiert und anschließend mit einem Sterilfilter (0,4 µm) sterilfiltriert. Um die Viruspartikel zu Pelletieren wurde der Überstand mit 50000 g 90 min bei 4 °C in der Ultrazentrifuge im Swingfront Rotor zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das nicht sichtbare Pellet am Boden in 50 µl PBS/1% BSA aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst. Die „Ernte“ wurde nach 72h nochmals wiederholt und anschließend die entstandenen Viruspartikel Suspensionen vereinigt, aliquotiert und bei – 80 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde wie unter 3.4.6 beschrieben getitert.

3.4.6 Titerbestimmung

Für die Titerbestimmung wurden HT1080 Zellen verwendet, die drei Stunden vor der Transduktion ausgesät wurden (1×10^5 Zellen in 1 ml in 12-Loch Gewebekulturplatten). Nach drei Stunden wurde das Medium abgenommen und durch 300 µl Kulturmedium mit 3µg Polyphen (Millipore; USA) ersetzt. Des Weiteren wurde eine Verdünnungsreihe der Virussuspension von 1:5000 bis 1:100 (drei Verdünnungsstufen) in insgesamt 200 µl Kulturmedium ebenfalls auf die Zellen gegeben. Jede Infektion wurde doppelt angesetzt. Nach 72 h wurden die Zellen mit 150 µl Trypsin für 1 min angelöst, mit 0,85 ml Kulturmedium suspendiert und in FACS-Röhrchen (Multimed Wickert, Deutschland) gegeben. Anschließend wurde der Anteil (in %) der infizierten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie am FACS (fluorescence activated cell sorting) der Firma BD Bioscience (Deutschland) bestimmt. Dies war möglich, da infizierte Zellen von nichtinfizierten durch die Fluoreszenz des GFP Proteins unterschieden werden können. Der Titer wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{TU/ml} = [\text{F} \times \text{C}/\text{V}] \times 1000$$

F = GFP-positive Zellen (Prozentual ermittelt durch FACS Analyse)

C = Zellzahl am Tag der Infektion

V = Volumen im Inoculum in μl

3.4.7 Transduktion von Hepatozyten mit lentiviralen Partikeln

Primäre humane Hepatozyten sind schwer zu transfizieren und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit stets mit lentiviralen Partikeln transduziert. Die lentiviralen Partikel wurden in den Versuchen mit einer MOI (multiplicity of infection) von drei transduziert. MOI3 wurde gewählt, um eine Balance zwischen Effekt des zu transduzierenden Moleküls und geringst möglicher Auslastung der microRNA-Prozessormaschinerie zu gewährleisten. Dies war notwendig, da sowohl die shRNA als auch die microRNA bzw. miRZip über denselben Mechanismus prozessiert werden, was zu einer Konkurrenzsituation führen kann und somit zu unspezifischen Nebeneffekten.

Die Transduktion der Hepatozyten wurde 4h nach Ankunft (Tag 0) in 12 Loch Platten à 400.000 Zellen pro Loch durchgeführt. Für die Transduktion wurde ein Mix aus 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Polyppren in 300 μl Vollmedium zu den Zellen gegeben, um sie permeabel für die Viruspartikel zu machen. Anschließend wurden ein Gemisch aus Viruspartikeln und Medium (200 μl gesamt Volumen) auf die Zellen gegeben. Nach 24h (Tag1) bei 37°C und 5% CO₂ wurde die Virensuspension durch 1 ml Medium ersetzt. Alle 24h wurde ein Mediumswechsel durchgeführt. Die Lyse der Hepatozyten erfolgte generell an Tag 5, wobei im Zeitreihenexperimente zusätzlich an Tag 4 und Tag 6 lysiert wurde.



3.4.8 Transduktion von Hepatozyten mit lentiviralen Partikeln und anschließende Agonistenbehandlung

Die Transduktion wurde wie unter 3.4.7 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden an Tag 4, also 24h vor der Lyse, die zuvor mit shRNAs transduzierten Hepatozyten mit Agonisten behandelt. Die Behandlung erfolgte mit einem spezifischen Agonisten (CITCO) des durch die shRNA herunterregulierten nukleären Rezeptors CAR. Für die Behandlung der Hepatozyten mit CITCO wurde eine Konzentration von 1 mM in 1 ml Vollmedium eingesetzt. Zudem wurden Hepatozyten derselben Charge zum Vergleich nur mit den Agonisten sowohl an Tag 4 als auch an Tag 1 behandelt. Jeweils 24h nach Behandlung wurden die Zellen lysiert und für weitere Analysen verwendet.

3.5 Leberbank

Die Leberbank des IKP wurde seit 1999, wie schon in (Lang et al., 2001) zuvor beschrieben in Kooperation mit dem Virchow-Klinikum Charité Berlin aufgebaut. Die Studie war von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität Berlin genehmigt worden. Sie besteht aus mehreren Gramm Lebergewebe, welches chirurgisch aus Tumor angrenzendem gesundem Gewebe bestehen. Das Gewebe wurde anschließend direkt in flüssigem Stickstoff oder in RNA-stabilisierendem Reagenz (RNAlater, Ambion) eingefroren, bei einer Ischämiezeit von unter 10 Minuten. Alle Patienten, haben eine schriftliche Einverständniserklärung abgeben, damit eine Blutprobe und Gewebe entnommen werden konnte. Zu jedem Patienten wurde ethnische Zugehörigkeit, das Geschlecht, das Alter, die zur Operation führende Diagnose, frühere Diagnosen, die Art der Operation, eine eventuelle regelmäßige Medikamenteneinnahme vor der Operation, der Raucherstatus (Nichtraucher; weniger als drei Zigaretten pro Tag; mehr als drei Zigaretten pro Tag), der Alkoholkonsum (keiner, gelegentlich, täglich, Missbrauch) und die Ernährungsgewohnheiten (Kaffee, Tee, salzarme Kost) dokumentiert. Außerdem sind Leberfunktionsparameter (gamma GT, AP, AST, Bilirubin) zu den jeweiligen Patientenproben verfügbar. Keinen Eingang in die Sammlung fanden Patienten mit schweren Lebererkrankungen (virale Hepatitis, Zirrhose).

3.5.1 Isolierung von microRNAs aus humaner Leber

Für die Isolierung der Gesamt-RNA (inklusive kleiner RNA Spezies) aus Lebergewebe wurde das mirVana Kit (Ambion) verwendet. Dafür wurde ca. 50 mg tief gefrorenes Lebergewebe von 150 Proben der Leberbank für die Aufarbeitung eingesetzt, welches mit Hilfe des FastPrep Gerätes homogenisiert wurde. Anschließend wurde nach den Herstellerangaben Kits die Aufarbeitung durchgeführt. Es wurde eine Endkonzentration von ca. 600 - 1200 ng/μl in 100 μl erreicht.

3.5.2 Qualitätsbestimmung der microRNA Aufarbeitung

Zur Überprüfung der Qualität der isolierten RNA und der darin enthaltenen microRNAs wurde das small RNA Kit für den Agilent Bioanalyzer 2100 verwendet, mit dem es möglich ist die Qualität einer RNA Probe zu bestimmen (Abb. 9). Da die Konzentrationen der zu messenden Proben sehr hoch war wurden sie auf 100-300 ng/μl verdünnt. Davon wurde 1 μl auf den Chip aufgetragen.

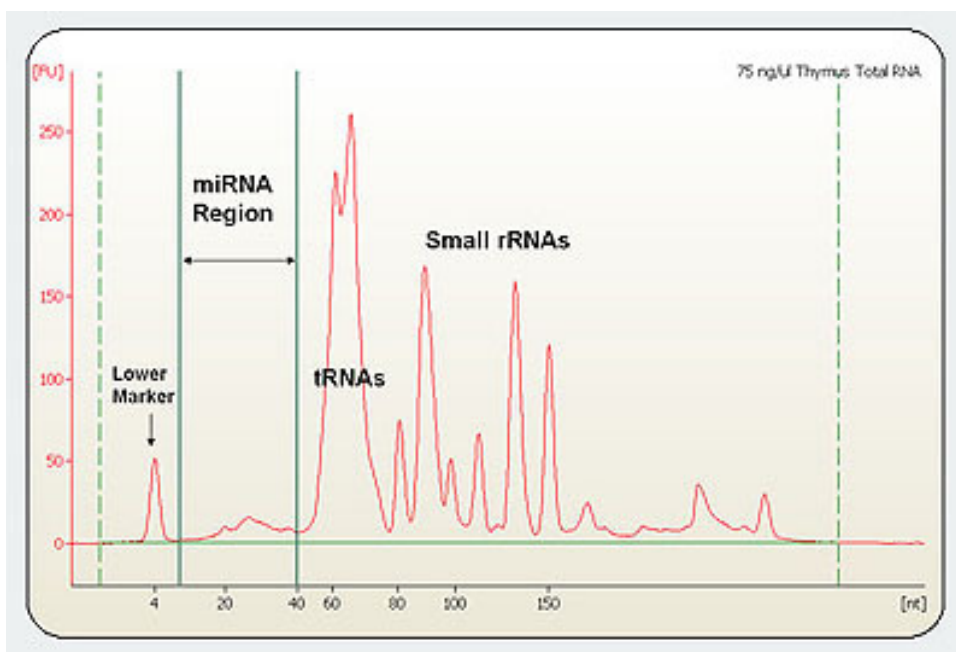


Abbildung 9: Agilent Bioanalyzer 2100 small RNA Kit Ergebnis. Mit dieser Technologie kann man die microRNA Konzentration und die Qualität der Aufarbeitung von Gesamt-RNA überprüfen (Abb. von Agilent Technologie).

Der prozentuale Anteil an microRNA variierten von Leber zu Leber. Zur Ermittlung der Konzentration der Gesamt-RNA wurden die Proben mit dem NanoDrop gemessen.

3.6 Methoden zur mRNA bzw. miRNA Quantifizierung

3.6.1 Reverse Transkription von microRNAs

Die isolierte Gesamt-RNA wurden mit dem Reverse Transkription Reagents Kit von Applied Biosystems und dem RT-Primer Pool A v 2.0 in 7 µl Reaktionsansätzen nach Herstellerangaben revers transkribiert. Bei den RT-Primern handelt es sich um spezielle Steam-Loop-Primer die 3 – 4 überhängende Basen am 5'-Ende besitzen, die spezifisch mit dem 3'-Ende der microRNA hybridisieren können. Diese wurden in einer Multiplex Reaktion die 377 spezifischen Steam-Loop-Primern beinhaltetete, eingesetzt. Damit wurde pro Ansatz zwischen 75 und 1000 ng Gesamt-RNA umgeschrieben. Die Bedingungen für die reverse Transkription waren:

40 Zyklen	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 s
1 Zyklus	85°C	5 min
	4°C	halten

3.6.2 Präamplifikation der mi-cDNA

Es wurde stets eine Präamplifikation der revers transkribierten RNA mit dem TaqMan® PreAmp Mastermix nach dem Protokoll von Applied Biosystems durchgeführt, um eine ausreichende Menge an Kopien der einzelnen microRNAs für spätere Messungen zu gewährleisten. Nach der Präamplifikation wurden die Proben 1:5 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und bei -20°C eingefroren, um zu einem späteren Zeitpunkt mittels quantitativer PCR gemessen werden zu können.



3.6.3 Quantitative PCR für microRNAs Expression

Zur Quantifizierung der microRNA Expression wurden drei Verfahren, basierend auf der TaqMan® Technologie, verwendet. Zum Einen herkömmliche real-time PCR Messung in 12 µl Ansätzen von einzelnen microRNAs im 384 Loch Format, wobei jeweils in Triplikaten gemessen wurde. Zum anderen wurde mit den TaqMan® Array Micro Fluid Cards A v 2.0" (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben Messungen durchgeführt. Für beide Messmethoden wurde das ABI 7900HT Fast real time RT-PCR System zur Detektion verwendet. Zur Quantifizierung der microRNA Expression in der Leberbank wurde ein 96.96 Dynamic Array Chip von Fluidigm verwendet der anschließend mit dem BioMark System gemessen wurde. Die Arrays wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und beladen. Dafür wurden 64 microRNA TaqMan® Assays von Applied Biosystems je 1:1 mit dem DA Assay Loading Reagenz (Fluidigm®) und die präamplifizierten Proben 1:1 mit 2x TaqMan® Mastermix no Amp Erase gemischt und je 5 µl in die dafür vorgesehenen Öffnungen pipettiert. Die Vereinigung im Chip von Assay und Probe erfolgte mit dem HX Fluidigm IFC controller. Einige microRNA Assays wurden in Duplikaten aufgetragen bzw. der Normierungsassay MammU6 wurde 4-Fach eingesetzt. Zusätzlich zu MammU6 waren noch die Normierungsassays RNU44 und RNU48 in Doppelbestimmungen auf dem Array.

3.6.4 cDNA Synthese für mRNA

Für die cDNA Synthese von mRNA wurde die mit dem mirVana Kit von Ambion isolierte mRNA verwendet. Die Konzentration wurde mit dem NanoDrop (PiqLap) und die Qualität mit dem Agilent Bioanalyzer bestimmt (siehe 3.5.2). Es wurde meist 1 µg Gesamt-RNA oder bei niedrigen Ausgangskonzentrationen 500ng für die reverse Transkriptase Reaktion eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt, in dem random Hexamer Primer(2,5µM), Multiscribe Reverse Transkriptase (1,25 U/µl), RNase Inhibitoren (0,4 U/µl), Magnesiumchlorid (5,5 mM), dNTP-Mix (je 500 µM) und TaqMan® RT Puffer (1x) (alles Applied Biosystems, Darmstadt) enthalten waren.



Die Reaktionsbedingungen betragen:

10 min	25°C
30 min	48°C
5 min	95°C.

Anschließend wurde die cDNA aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

3.7 Analytische Methoden

3.7.1 Aktivitätsmessungen der Cytochrom P450 Enzyme mit dem Cocktail-Assay

Cytochrom P450 Aktivitäten wurden mit dem Cocktail-Assay nach (Feidt et al., 2010) im Mediumsüberstand von primären humanen Hepatozyten ($0,4 \times 10^6$ Zellen in einem Loch einer 12 Lochplatte) bestimmt. Im Cocktail-Assay sind spezifische Modell Substrate für die Enzyme CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4, wie unter Tabelle 22 aufgeführt, enthalten.

3.7.2 Cocktail-Assay Zusammensetzung und Anwendung

Der Cocktail Mix wurde vor jeder Inkubation frisch angesetzt wobei die einzelnen Substratlösungen in den Konzentrationen wie in Tabelle 26 aufgeführt in Williams E Medium mit Zusätzen vereinigt wurden. Pro Loch einer 12 Loch Platte wurde 1ml der Substratlösung gegeben und nach dreistündiger Inkubation der Überstand abgenommen. Davon wurde 50 µl mit 5 µl 250 mM Ameisensäure versetzt, um die Reaktion abzustoppen. Vor der Messung wurde der abgestoppte Ansatz mit 5 µl des Internen Standards versetzt bei 10000 g 5 min zentrifugiert und 55 µl in ein Eppendorf Gläschen mit Inlets überführt.



Tabelle 22: Zusammensetzung des Cocktail Assays

P450	Substrat	Molmasse [g/mol]	Konz. Stock [mM]	Lösungsmittel	Konz. im Experiment [μM]
CYP1A2	Phenacetin	179,2	100	DMSO	50
CYP2B6	Bupropion	256	50	H ₂ O	25
CYP2C8	Amodiaquin	464,8	10	H ₂ O	5
CYP2C9	Tolbutamid	270,1	100	ACN	100
CYP2C19	S-Mephenytoin	218,1	100	ACN	100
CYP2D6	Propafenon-HCl	377,9	10	MeOH	5
CYP3A4	Atorvastatin (1/2 Ca ²⁺)	558,6	5	ACN/H ₂ O	35

3.7.3 Eichgerade für den Cocktail Assay

Für jeden Analyten wurde mit Hilfe des entsprechenden internen Standards eine Eichgerade aus der CYP-Mix Stocklösung erstellt. Für die quantitative Auswertung wurden Eichpunkte von 5 μM bis 0,005 μM benutzt. Die Konzentration des internen Standards [$^2\text{H}^5$] o-Hydroxyatorvastatin betrug 0,5 μM , die für alle anderen Substanzen 2,5 μM . Die Eichpunkte wurden entsprechend den Proben, in 50 μl Hepatozytenmedium (Hepatozyten) angesetzt, mit 5 μl 250mM Ameisensäure und 5 μl internem Standard versetzt. Die Eichreihe wurde vor jeder Messung analog zu den Proben neu hergestellt. Zusätzlich mussten drei Qualitätskontrolllösungen für drei verschiedene Eichpunkte bereitgestellt werden, die in der Messung zwischen den Proben gemessen wurden, um eine möglichst konstante Qualität der Messung bei größeren Probenanzahlen zu gewährleisten. Zur Messung der Proben und der Eichreihe wurde das Triple Quadrupol Massenspektrometer verwendet.

3.8 Statistische Methoden

Assoziationen zwischen RNU48 normierten miRNA-Expressionswerten und nicht-genetischen Faktoren wurden mit Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests untersucht. Resultierende P-Werte wurden mit dem Verfahren von Benjamini und Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) auf multiples Testen angepasst. Die Auswertung erfolgte mit der statistischen Analysesoftware R-2.13.0 (www.r-project.org) und der Hilfe von Dr. Stefan Winters. Spearman-Korrelationstests zwischen normierten miRNA-Expressionswerten und RPLP0 normierten mRNA-Expressionswerten bzw. β -Aktin normierten Protein Expressionswerten wurde mit zur Hilfenahme der Software GraphPad Prism v5.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) durchgeführt.





4 ERGEBNISSE

4.1 MIRNA-DISTILLER

Wie in der Einleitung unter 1.2 beschrieben gibt es verschiedene Datenbanken, die microRNA Bindestellen für Gene mittels unterschiedlicher Algorithmen berechnen und somit microRNA-Zielgen Interaktionen vorhersagen können. Die Vorhersagen variieren zum Teil sehr stark, je nach Datenbank und deren zur Berechnung verwendeten Algorithmen. Um möglichst genaue Vorhersagen zu erhalten, ist es daher empfehlenswert, mehrere Datenbanken zu verwenden, um Ergebnisse zu vergleichen und eine Schnittmenge zu bilden. Dies ist für Untersuchungen von wenigen Genen ($n < 10$) mit den üblichen Datenverarbeitungsprogrammen möglich, jedoch können solche Analysen mit einer größeren Anzahl an Genen ($n > 10$) sehr zeitintensiv und unübersichtlich werden.

Da im Rahmen dieser Doktorarbeit möglichst viele ADME Gene auf microRNA Regulation überprüft werden sollten, war es notwendig, ein Programm zu entwickeln, welches es erstmalig ermöglicht, größere Mengen von microRNA Vorhersagedaten zu verarbeiten und übersichtlich darzustellen. Dieses Programm, MIRNA-DISTILLER, sollte vorhergesagte microRNA-Bindestellen für beliebig viele Gene aus drei Datenbanken (TargetScan, microCosm und miRDB) herunterladen. Dabei sollte das Herunterladen sowohl manuell, für jedes Gen einzeln, oder in einer automatisierten Abfrage für alle im Programm präsenten Gene geschehen, um die Aktualisierung bereits vorhandener Daten einfacher zu gestalten. Darüber hinaus sollte es mit diesem Programm möglich sein, ein größeres Genset, wie z.B. die ADME Gene, nach potentiellen Bindestellen zu untersuchen und Schnittmengen aus drei Datenbanken für jedes einzelne Gen zu berechnen.

Des Weiteren war es notwendig Funktionen zu implementieren, die es ermöglichen verschiedene Filteroperationen durchzuführen, ein „Ranking“ unter den microRNAs, gemäß einer vom Anwender gewählten Gen-Zusammenstellung zu erstellen und die Daten übersichtlich und grafisch darzustellen. Eine interaktive benutzerfreundliche Oberfläche sollte ebenfalls geboten sein und das Einbinden von eigenen experimentell generierten Daten, zum Beispiel für die Erstellung eines Filters, sollte möglich sein.

Die Programmierung wurde in Zusammenarbeit mit Denis A. Bodan in der Entwicklerumgebung Visual Basic.net von Microsoft durchgeführt.

4.1.1 Aufbau des MIRNA-DISTILLER am Beispiel der ADME Gene

MIRNA-DISTILLER ist in drei Register aufgeteilt:

Das „Genes“ Register ist das Hauptregister. Abbildung 10 zeigt eine ADME Gen Selektion von 62 Genen, die in das Programm geladen wurden (siehe 4.1.4). Darin enthalten waren die wichtigsten Transporter, nukleären Rezeptoren, Phase I und Phase II Enzyme, sowie weitere zugehörige Regulatoren und Kofaktoren (siehe Tab. 23). Mittels der Funktion „microRNA Search“ werden die vorhergesagten microRNAs für diese Gene automatisch mit dem dazugehörigen „Score“ der einzelnen Datenbanken heruntergeladen. Die vorhergesagten microRNAs für jedes Gen werden in Spalten nach den drei Datenbanken sortiert und angezeigt. Eine weitere Spalte berechnete die Übereinstimmungen der Datenbankergebnisse untereinander und bildete die Schnittmenge.

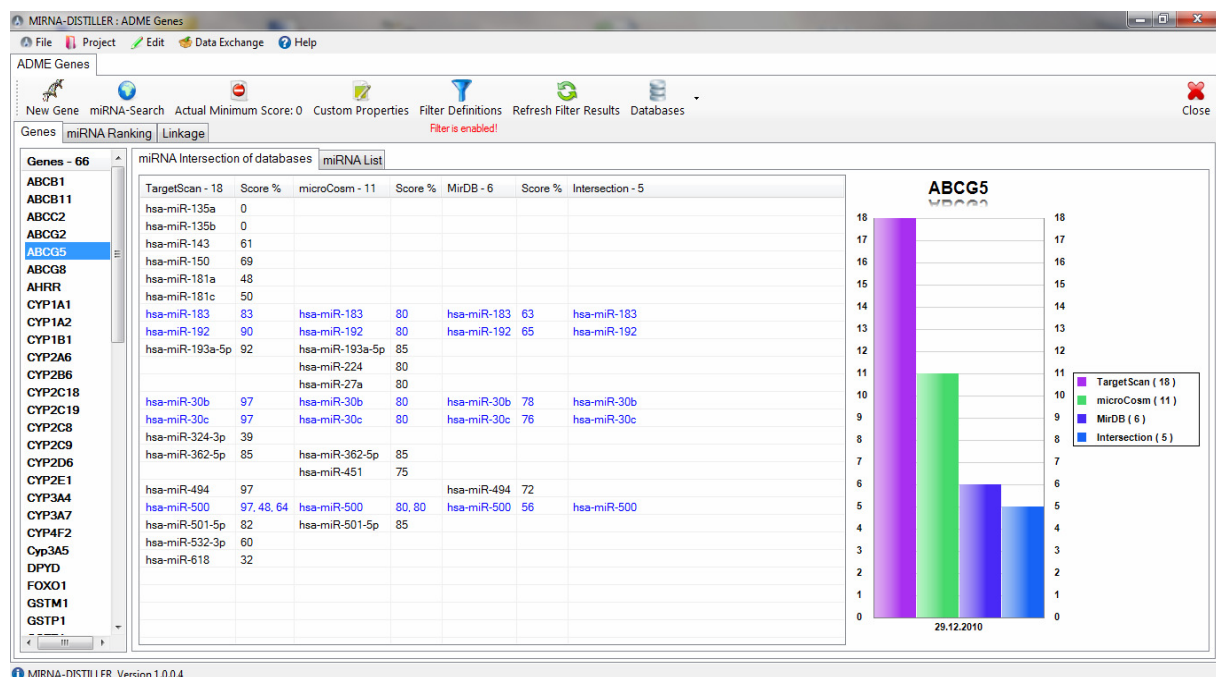


Abbildung 10: Hauptregister des MIRNA-DISTILLER. Auf der linken Seite sind die Gene gelistet, die zuvor in das Programm geladen wurden. Nach Auswahl eines Gens aus der Liste werden die dazugehörigen Vorhersagen der drei Datenbanken mit zugehörigem „Score“ angezeigt und zusätzlich die Schnittmenge aus den drei Vorhersagen gebildet. Dies wird durch ein Balkendiagramm grafisch auf der rechten Seite dargestellt.

Um die Übereinstimmungen vorhergesagter microRNAs der einzelnen Datenbanken zu vergleichen, wurde eine grafische Darstellung im Balkendiagramm-Format implementiert. In Abbildung 11 sind Beispiele dieser Diagramme gezeigt, welche mit einer im Programm zur Verfügung stehenden Export Funktion in gängigen Bildformaten exportiert werden können. Eine Export Funktion steht auch für die Ergebnistabellen für jedes Gen zur Verfügung. Diese Ausgabe kann als Text oder als Excel Tabelle für weitere Analysen verwendet werden.

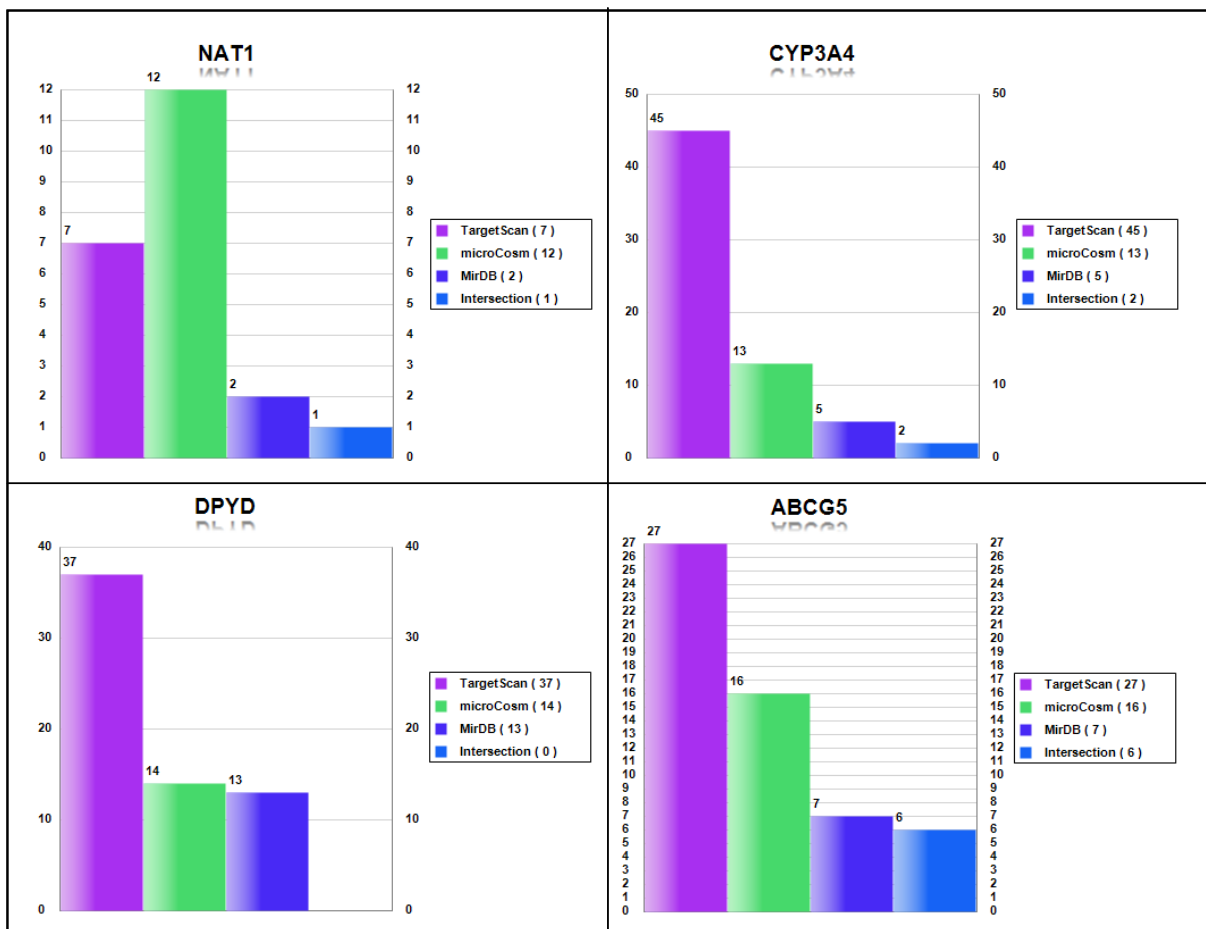


Abbildung 11: Vorhersageergebnisse und Schnittmengen, die mit dem MIRNA-DISTILLER analysiert wurden; exemplarisch für NAT1, CYP3A4, DPYD und ABCG5.

Ein weiteres Register, „microRNA Ranking“, erstellt eine Liste der zuvor in das Programm geladenen microRNAs und sortiert diese nach Vorhersagehäufigkeit in einem selbst gewählten Genset. Auf Abbildung 12 ist eine solche Liste für die ADME Gene aufgezeigt. Mit dem Cursor können einzelne microRNAs ausgewählt werden, wodurch auf der rechten Seite eine Auflistung der Gene erscheint, die eine vorhergesagte Bindestelle für die markierte

microRNA in ihrer 3'UTR besitzen. Diese Funktion gibt es in den verfügbaren Datenbanken zwar auch, jedoch nicht für ein spezifisches Genset. Es können nur globale Abfragen getätigt werden, was in einer Liste resultiert, die alle potenziellen Zielgene dieser microRNA enthält, mit meist mehr als 1000 Genen.

Bei der Anwendung des „Rankings“ auf das ADME Gensets befanden sich jedoch unter den ersten 20 microRNAs nur vier leberexprimierte microRNAs, da die Datenbanken nicht gewebespezifisch filtern. Jedoch sollte in dieser Arbeit die microRNA Regulation von leberspezifischen Genen in der Leber untersucht werden, wozu es notwendig war, die Vorhersagedaten dementsprechend zu filtern.

The screenshot shows the MIRNA-DISTILLER software interface. The main window is titled "MIRNA-DISTILLER : ADME Genes". The interface is divided into several sections:

- miRNA Ranking:** A table listing microRNAs and their associated data. The row for hsa-miR-9 is highlighted in blue.
- Appearance of Each miRNA:** A tree view showing target genes for hsa-miR-9, categorized by database (TargetScan, microCosm, MirDB). Target genes include AHRH, CYP1B1, FOXO1, HNF4a, INSIG1, INSIG2, PON1, PPARA, RXRA, SLC22A3, SLC2A2, SLCO2B1, TPMT, and VDR.
- Custom Properties:** A table showing properties for the selected miRNA. The "expressed" property has a value of 16.553, and the "liver tissue" property has a value of 18.16525.

Name	Count miRNA's	Count Genes	Count Databases
hsa-miR-548d-5p	60	27	3
hsa-miR-548c-3p	56	21	2
hsa-miR-579	35	21	3
hsa-miR-539	33	18	3
hsa-miR-570	33	18	3
hsa-miR-200a	31	14	3
hsa-miR-211	29	18	3
hsa-miR-203	29	19	3
hsa-miR-9	29	17	3
hsa-miR-330-3p	28	18	3
hsa-miR-204	28	18	3
hsa-miR-136	28	15	3
hsa-miR-340	27	16	3
hsa-miR-186	26	17	3
hsa-miR-24	25	19	3
hsa-miR-27a	25	17	3
hsa-miR-141	25	14	3
hsa-miR-428-5p	25	13	3
hsa-miR-410	25	15	3
hsa-miR-532-3p	24	16	3
hsa-miR-520g	24	14	3
hsa-miR-150	23	18	3
hsa-miR-27b	22	15	3
hsa-miR-193a-5p	22	14	3
hsa-miR-182	22	13	3
hsa-miR-125a-3p	21	13	2

Name	Wert
expressed	16.553
liver tissue	18.16525

Abbildung 12: Das microRNA Ranking Register zeigt alle microRNAs, die zuvor in das Programm geladen wurden. Diese werden automatisch nach Vorkommen im selbst gewählten Genset sortiert. Es ist auch möglich, microRNAs alphabetisch aufzulisten. Zudem werden durch Auswählen einer microRNA alle Zielgene aus dem Genset in Listenform angezeigt,

Deshalb wurde ein benutzerdefinierter Filter entwickelt, der eine sinnvolle Reduzierung der Daten ermöglicht und darüber hinaus für sämtliche Fragestellungen konfigurierbar war. Dies setzt voraus, dass jeder einzelnen microRNA Eigenschaften zugewiesen werden können, um anschließend den Filter nach den zuvor definierten Eigenschaften zu konfigurieren und die Daten danach zu filtern. Diese Zuweisung von Eigenschaften kann mittels der im Programm vorhandenen Import Funktion durchgeführt werden. Eigenschaften können sowohl Zahlen, wie z.B. Expressionslevels, oder aber logische Wörter wie ja, nein, vielleicht usw. sein. Der Filter kann damit immer wieder auf den neusten Stand der Forschung angepasst und aktualisiert werden. Auch ist eine parallele Nutzung von mehreren Filtern auf den gleichen Datensatz möglich. Dies ermöglichte es erstmalig spezielle microRNA Unterklassen aus einem Datensatz „heraus zu destillieren“.

Ein mögliches Beispiel wäre eine Unterklasse von microRNAs, die in der Leber und im Darm exprimiert sind, nicht aber in der Niere. Ein weiterer vordefinierter Filter, der die Daten nach dem von den Datenbanken bereitgestellten Bindungsscore filtert, ist zudem fest integriert. Dieser kann in Kombination zu anderen Filtern oder als selbständiger Filter angewendet werden. Dies ermöglicht eine Reduktion der Vorhersagedaten nach Bindungswahrscheinlichkeit und kann eine mögliche erste Maßnahme zur Priorisierung der Daten sein.

Ein drittes Register „Linkage“ (Abb. 13) wurde als grafische Darstellung in Matrix Form entwickelt, um mögliche Koregulationen zu veranschaulichen. Gene mit ähnlichen microRNA Vorhersage Profilen werden in der Monochrom-Ansicht in schwarz und in der Temperatur-Ansicht in rot dargestellt. Die einzelnen Felder in der Matrix sind aktiv und können angewählt werden, um eine Detailansicht der Übereinstimmungen zu erhalten (Abb. 13 rechts).

Die Daten der Matrix sind wie die Daten aller anderer Register, den Filteroptionen untergeordnet und werden nach Filterung der Daten neu berechnet und dargestellt. Somit ist eine Datenreduzierung auch in diesem Register möglich.



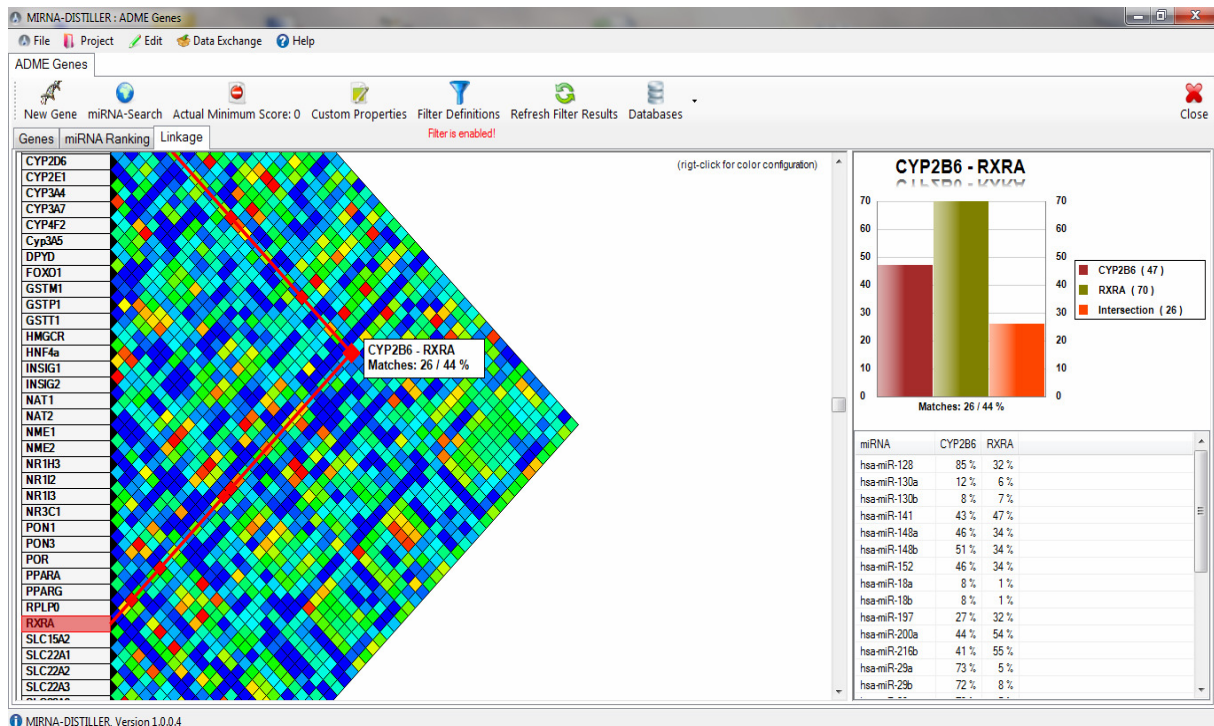


Abbildung 13: Das „Linkage“ Register berechnet automatisch jede Gen zu Gen Übereinstimmung an microRNA Vorhersagen und visualisiert dies in einer Matrix. Mit dieser Funktion können mögliche Koregulationen sichtbar gemacht werden. Zuvor definierte Filtereinstellungen werden in dieser Darstellung berücksichtigt.

4.1.2 Test und Optimierung des MIRNA-DISTILLER

Um ein fehlerfreies und zuverlässiges Arbeiten mit MIRNA-DISTILLER zu garantieren, wurden während der Entwicklungsphase des Programms alle Funktionen kontinuierlich durch Tests überprüft und in interaktiver Zusammenarbeit mit Denis A. Bodan diskutiert. Sofern Fehler aufgetreten waren wurden diese eliminiert. Getestet wurde das korrekte Wiedergeben der heruntergeladenen Daten und die Berechnung der Schnittmengen. Des Weiteren musste die Darstellung der „Linkage“ Abbildung auf fachlich korrekte Ausgabe und der zur Grunde liegenden Berechnung überprüft werden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt war die Prüfung der konfigurierbaren Filter auf Anwendbarkeit in möglichst vielen verschiedenen Szenarien. Auch wurden im Testverfahren immer wieder Funktionen optimiert oder gegebenenfalls durch neue, nützlichere Funktionen ersetzt. So entstand ein Programm, das auf der Basis von Anwenderbedürfnissen entwickelt wurde.

MIRNA-DISTILLER ist auf der Homepage des IKP-Stuttgarts (<http://www.ikp-stuttgart.de/content/language1/html/10415.asp>) frei verfügbar und kann dort heruntergeladen werden. In der Zeitschrift „Frontiers in Genetics“, unter der Rubrik „Non-coding RNAs“, wurde MIRNA-DISTILLER im Juni 2011 veröffentlicht.

4.1.3 Anwendungsbeispiel einer publizierten Gen-microRNA Interaktion zur Validierung von MIRNA-DISTILLER

Zur Validierung des Programms wurden Zielgene der leberspezifischen microRNA miR-122 in MIRNA-DISTILLER geladen. Diese 42 Zielgene stammten aus der Datenbank miRTarBase V 2.1 und waren aus der Literatur bekannt. MicroRNA-Gen Interaktionen, die in der miRTarBase Datenbank zu finden sind, sind durch verschiedene experimentelle Methoden wie Luciferase Assays oder Westernblot bereits validiert. Für diese 42 Zielgene der miR-122 wäre zu erwarten, dass im „miRNA Ranking“ Register die miR-122 an erster Stelle der Liste erscheinen würde, da sie die microRNA sein müsste, die am häufigsten in diesem Genset vorkommt.

Abbildung 14 zeigt einen Ausschnitt des microRNA „Rankings“ der miR-122 Zielgene. Wie erwartet war die miR-122 an erster Stelle und wurde für 34 der 42 Gene vorhergesagt. Die miR-122 war damit in diesem Genset mit Abstand am häufigsten vorhergesagt. Dieses Beispiel zeigte, dass mit MIRNA-DISTILLER bekannte Interaktionen gefunden werden können und sollte daher auch für unbekannte miRNA-Zielgen Interaktionen nützlich sein.



MIRNA-DISTILLER : example file miR122

File Project Edit Help

example file miR122

New Gene miRNA-Search Actual Minimum Score: 0 Custom Properties Filter Definitions Refresh Filter Results Databases

Genes miRNA Ranking Linkage

miRNA Ranking

Name	Count miRNA's	Count Genes	Count Databases
hsa-miR-122	62	34	3
hsa-miR-1207-5p	46	25	2
hsa-miR-548c-3p	68	24	2
hsa-miR-603	41	24	3
hsa-miR-1827	37	22	2
hsa-miR-574-5p	26	20	3
hsa-miR-1184	33	20	2
hsa-miR-940	39	20	3
hsa-miR-519d	39	19	3
hsa-miR-520a-3p	33	19	3
hsa-miR-1205	32	19	2
hsa-miR-144	32	19	3
hsa-miR-298	28	19	2
hsa-miR-875-3p	31	19	2
hsa-miR-20a	39	18	2
hsa-miR-583	24	18	3
hsa-miR-607	37	18	3
hsa-miR-20b	39	18	2
hsa-miR-93	39	18	2
hsa-miR-106a	39	18	2
hsa-miR-329	35	18	2
hsa-miR-129-5p	34	18	2
hsa-miR-220c	34	18	2
hsa-miR-17	39	18	2
hsa-miR-106b	40	18	3
hsa-miR-587	28	18	3
hsa-miR-302d	33	18	3

Appearance of Each miRNA

hsa-miR-122

TargetScan

- AACS - 63 %
- ADAM17 - 95 %
- AKT3 - 99 %
- ALDOA - 90 %
- ANK2 - 74 %
- AP3M2 - 59 %
- ATP1A2 - 43 %
- ATP1A2 - 90 %
- ATP1A2 - 76 %
- BCL2L2 - 48 %
- CCNG1 - 98 %
- CD320 - 66 %
- CD320 - 59 %
- DUSP2 - 92 %
- EGLN3 - 84 %
- FOXJ3 - 94 %
- FOXP1 - 76 %
- FUNDC2 - 97 %
- G6PC3 - 89 %
- GALNT10 - 38 %
- GALNT10 - 86 %
- GYS1 - 0 %
- GYS1 - 93 %
- GYS1 - 67 %
- IGF1R - 35 %
- IGF1R - 20 %

Genes

- AACS
- ADAM17
- AKT3
- ALDOA
- ANK2
- AP3M2
- ATP1A2
- BCL2L2
- CCNG1
- CD320
- DUSP2
- EGLN3
- FAM117B
- FOXJ3
- FOXP1
- FUNDC2
- G6PC3
- GALNT10
- GTF2B
- GYS1
- IGF1R
- MAPK11
- MECP2
- NCAM1
- NDRG3
- NFATC2IP
- NUMBL
- RAB11FIP1
- RAB6B
- SLC7A1
- SLC7A11

Abbildung 14: Anwendungsbeispiel für validierte Zielgene der miR-122: an erster Stelle des microRNA Rankings für dieses Genset steht die miR-122 mit 34 vorhergesagten Zielgenen von 42 validierten.

4.1.4 Anwendung des MIRNA-DISTILLER auf ein ADME Genset

Um microRNA Regulationen in der Leber und vor allem im Fremdstoffmetabolismus (ADME Gene) zu untersuchen, wurde eine Liste von 62 besonders interessanten Genen (siehe Tab. 23) erstellt und in den MIRNA-DISTILLER geladen. Diese enthielten Transporter, Phase I Enzyme, Phase II Enzyme, Regulatoren und sonstige in der Leber exprimierte und wichtige Gene.

Tabelle 23: ADME Gen Auswahl für die MIRNA-DISTILLER Analysen

Transporter n=17	Phase I n=17	Regulatoren n=14	Phase II n=8	Sonstige n=6
ABCB1	CYP1A1	AHRR	ALDH2	ACOX2
ABCB11	CYP1A2	FOXO1	GSTM1	CRP
ABCC2	CYP1B1	HNF4 α	GSTP1	DPYD
ABCG2	CYP2A6	INSIG1	GSTT1	HMGCR
ABCG5	CYP2B6	INSIG2	NAT1	NME1
ABCG8	CYP2C18	NFKB1	NAT2	NME2
SLC15A2	CYP2C19	NR0B2	PON1	
SLC22A1	CYP2C8	NR1H3	PON3	
SLC22A2	CYP2C9	NR1I2		
SLC22A3	CYP2D6	NR1I3		
SLC22A6	CYP2E1	NR3C1		
SLC22A7	CYP3A4	PPAR α		
SLC2A2	CYP3A43	PPAR γ		
SLC47A1	Cyp3A5	RXR α		
SLCO1B1	CYP3A7			
SLCO1B3	CYP4F2			
SLCO2B1	POR			

Dabei wurde festgestellt, dass sich die microRNA Vorhersagen der drei Datenbanken bezüglich dieser Gene erheblich unterschieden und die Schnittmenge sehr gering war. Auch wurden einige Bindestellen für microRNAs, für diese meist leberspezifischen Gene vorhergesagt, die nicht in der Leber exprimiert werden und damit an der Regulation dieser Gene in der Leber keine Rolle spielen können. Um Expressionsprofile von microRNAs in Leber zu erhalten und anschließend diese Daten als Grundlage zum Erstellen eines Filters zu

nutzen, wurden Expressionen von microRNAs in humanen Lebergeweben und Hepatozyten mittels quantitativer PCR gemessen. Diese Messungen wurden mit einem Microfluidics System (TaqMan® Array Micro Fluid Cards) von Applied Biosystems durchgeführt. Dafür wurde in vier Lebergewebe Pools à 10 Proben und in drei verschiedenen unbehandelten Hepatozytenchargen die Expression von 380 microRNAs gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind im Anhang in Tabelle 36 gezeigt. Von den 380 gemessenen microRNAs lagen 137 sowohl in den Leberpools als auch in den Hepatozyten unterhalb der Detektionsgrenze und wurden als nicht exprimiert gewertet. Die Expressionsprofile der Leberpools und der Hepatozyten unterschieden sich, wobei manche microRNAs einen deutlichen Unterschied aufwiesen, jedoch die meisten sich ähnlich verhielten. Der Expressionsunterschied von einzelnen microRNAs kann auf die inhomogene Morphologie des Lebergewebes zurückgeführt werden, da ca. 20% des Lebergewebes nicht aus Hepatozyten besteht. Eine unterschiedliche Regulation der Expression in Hepatozyten in Kultur verglichen mit Lebergewebe kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, da umfangreiche Genexpressionsunterschiede auch hinsichtlich anderer Gene beobachtet wurde. Sowohl in Hepatozyten als auch in Lebergewebe hoch exprimierte microRNAs waren z.B. miR-19b, miR-223, miR-26a, miR-106a, miR-17, miR-24, miR-192, miR-574-3p, miR-126, miR-191, miR-16 und miR-122.

Die gemessenen Expressionsdaten (Anhang Tab. 30) wurden dann mit der Import Funktion in den MIRNA-DISTILLER geladen und als Grundlage zur Datenfilterung für leberexprimierte microRNAs verwendet. Nach Erstellen und Ausführen des Filters reduzierten sich die Vorhersagen im Mittel um 75%. Die verbliebenen 25% wurden zusätzlich einem Score Filter unterzogen, um microRNAs mit einem Score unter 70 auszuschließen. Des Weiteren wurden nur die microRNAs berücksichtigt, die von mehr als einer Datenbank vorhergesagt wurden, um die Spezifizierung der Datenfilterung um ein weiteres Kriterium zu ergänzen. Die Ergebnisse dieser Filteroperationen sind in Tabelle 31 im Anhang aufgezeigt. In den nachfolgenden Versuchen wurden die Analysen des MIRNA-DISTILLER immer wieder als Grundlage zur Hypothesengenerierung in Anspruch genommen.



4.2 Überexpression und Herunterregulierung von microRNAs in primären humanen Hepatozyten mit lentiviralen Vektoren

Zur Untersuchung des Einflusses von bestimmten microRNAs auf ADME Gene in der Leber wurden primäre humane Hepatozyten verwendet, da diese eine intakte Regulationsmaschinerie und eine mit der Leber vergleichbare Expression der ADME Gene aufweisen. Wie in der Einleitung unter 1.6. beschrieben, ist eine gute Transfektionseffizienz mit herkömmlichen Transfektionsreagenzien in Hepatozyten nur unzureichend möglich. Deshalb wurden primäre humane Hepatozyten in dieser Arbeit stets mit lentiviralen Partikeln transduziert. Eine Transduktion der Hepatozyten mit microRNA Expressionsvektoren (pCDH, System-Biosciences, Mountain View) sollte die intrazelluläre Konzentration einer spezifischen microRNA gezielt erhöhen, um deren Einfluss auf mögliche Zielgene zu untersuchen. Zur Berücksichtigung unspezifischer Seiteneffekte, die durch die Virusinfektion auftreten können, wurden Kontrollvektoren verwendet, die entweder keine microRNA kodierende Sequenz (miMock) oder eine für eine kleine RNA kodierende Sequenz, welche nicht komplementär zu humanen Genen ist und deshalb auch keine regulatorischen Eigenschaften haben sollte (miRZip K), beinhalteten. Für Knock-down Experimente wurden Vektoren, sogenannte miRZips (System-Biosciences, Mountain View), verwendet, die komplementäre Sequenzen zu den zu untersuchenden microRNAs aufwiesen. Dadurch konnte, durch perfekte Basenpaarung, die Konzentration dieser microRNAs erniedrigt werden. Die herunterregulierten microRNAs sollten dann nicht mehr in der Lage sein potentielle Zielgene zu beeinflussen, was im klassischen Fall in einer Erhöhung der Expression des Zielgens resultieren sollte.

4.2.1 Auswahl der zu untersuchenden microRNAs

Die nachfolgenden Versuche wurden mit den microRNAs miR-143, miR-148a und miR-27b durchgeführt. Die Auswahl von miR-148a und miR-27b erfolgte aufgrund der in der Literatur beschriebenen Bedeutung dieser microRNAs in der Leber und der Regulation von ADME Genen. Zudem wurden mit dem MIRNA-DISTILLER weitere potentielle Zielgene gefunden (Abb. 15).

Eine weitere, im Zusammenhang mit ADME Gen Regulation unbekannt microRNA (miR-143) wurde ausgewählt, da diese in den MIRNA-DISTILLER Analysen viele Zielgene im ADME

Bereich aufwies. MicroRNA miR-143 hatte, was vorangegangene Expressionsmessungen ergaben (Anhang Tab. 30), eine relativ niedrige Expression in der Leber. Dies könnte möglicherweise ein Indiz für die Regulation von in der Leber hoch exprimierten Zielgenen sein.

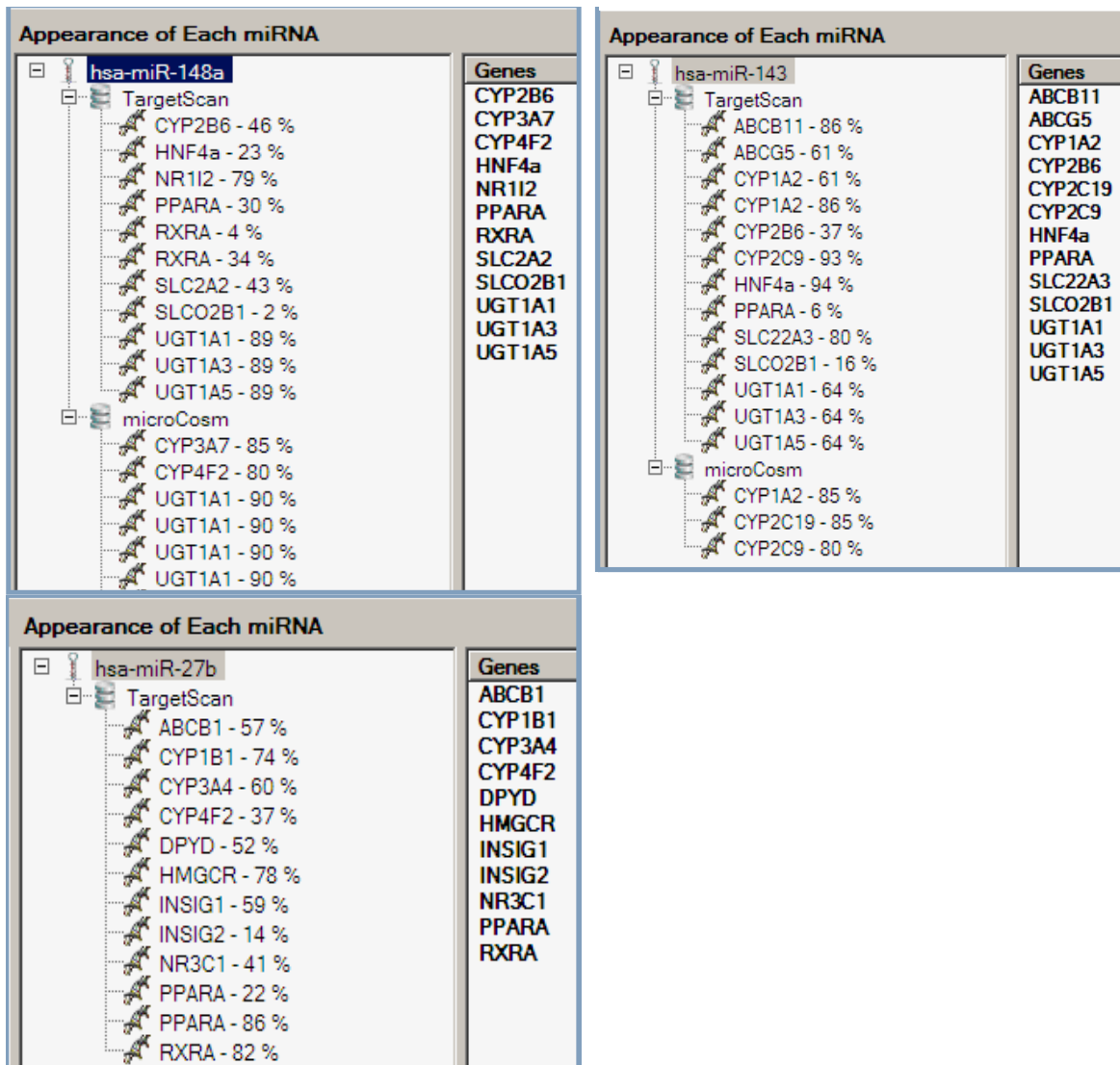


Abbildung 15: Vorhergesagte Zielgene der für die Virus Experimente verwendeten microRNAs, miR-143, miR-148a und miR-27b.

4.2.2 Zeitreihe

Es wurden wie unter 3.4.5 beschrieben, Viruspartikel für die microRNAs miR-143, miR-148a und miR-27b, mit lentiviralen Überexpressionsvektoren (pCDH143, pCDH148a und pCDH27b) und Knock-down Vektoren dieser microRNAs (pmiRZip143, pmiRZip148a und pmiRZip27b) produziert, die anschließend für einen Zeitreihenversuch getestet und verwendet wurden. Ziel des Versuches war es, herauszufinden, wie sich die Expression der microRNAs bzw. mRNAs und die Aktivität der CYPs über den Zeitraum verhält, um daraufhin einen passenden Zeitpunkt für weitere Experimente abzuleiten

Der schematische Versuchsaufbau ist in Abbildung 16 dargestellt. Der Versuch wurde im 12 Loch Format mit 400.000 Zellen pro Loch durchgeführt. Für jeden Zeitpunkt und jedes Konstrukt wurde in Triplikaten gearbeitet. Die Zellen wurden mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 3 pro Ansatz transduziert. Als Zeitpunkte wurden 96h (4 Tage), 120h (5 Tage) und 144h (6 Tage) nach Infektion gewählt. Dabei wurde eine Mock Kontrolle für den pCDH Vektor (miMock) und eine „scrambled“ RNA Kontrolle für die pmiRZip Vektoren (miRZip K) verwendet.



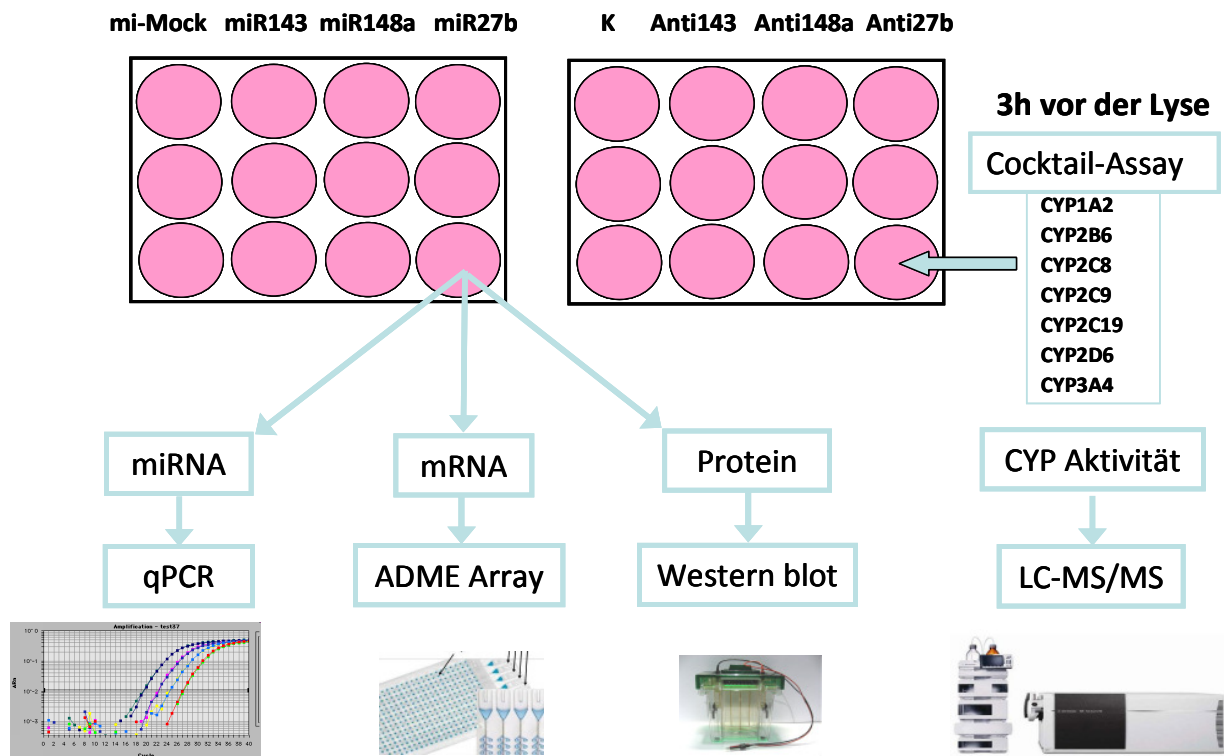


Abbildung 16: Durchführung eines Virusexperimentes in Hepatozyten. Die Infektion fand im 12 Lochformat mit 400.000 Zellen pro Loch (0h) statt. Nach 96h, 120h und 144h wurden die Zellen lysiert. 3h vor der Lyse wurden die Zellen, mittels Cocktail Assay, zur Aktivitätsbestimmung von sieben Cytochrom P450 Monooxygenasen, inkubiert und die Umsatzraten anschließend mit LC-MS/MS quantifiziert. Des Weiteren wurde von jeder Behandlung, aus dem selben Lysat, RNA und Protein isoliert und für die Quantifizierung der miRNA, mRNA und Protein Expression verwendet.

Wie Abbildung 17 zeigt, war die Expression der drei transduzierten microRNAs in Zeitverlauf unterschiedlich. Die Expression der miR-143 zeigte einen linearen Anstieg über die drei Zeitpunkte und war nach 144h mehr als 8500-fach höher exprimiert. Jedoch wurde ein Knock-down lediglich 120h nach der Infektion beobachtet. Für miR-143 war demzufolge 120h nach der Infektion der beste Zeitpunkt, da zu diesem Zeitpunkt eine deutliche Erhöhung der miR-143 Expression und ein maximaler Knock-down erreicht wurde.

MiR-148a zeigte eine deutlich schwächere Überexpression und es wurde kein messbarer Knock-down der miR-148a beobachtet. Da jedoch die basale Expression der miR-148a in humanen Hepatozyten deutlich höher ist als für miR-143, ist dieser Effekt erklärbar.

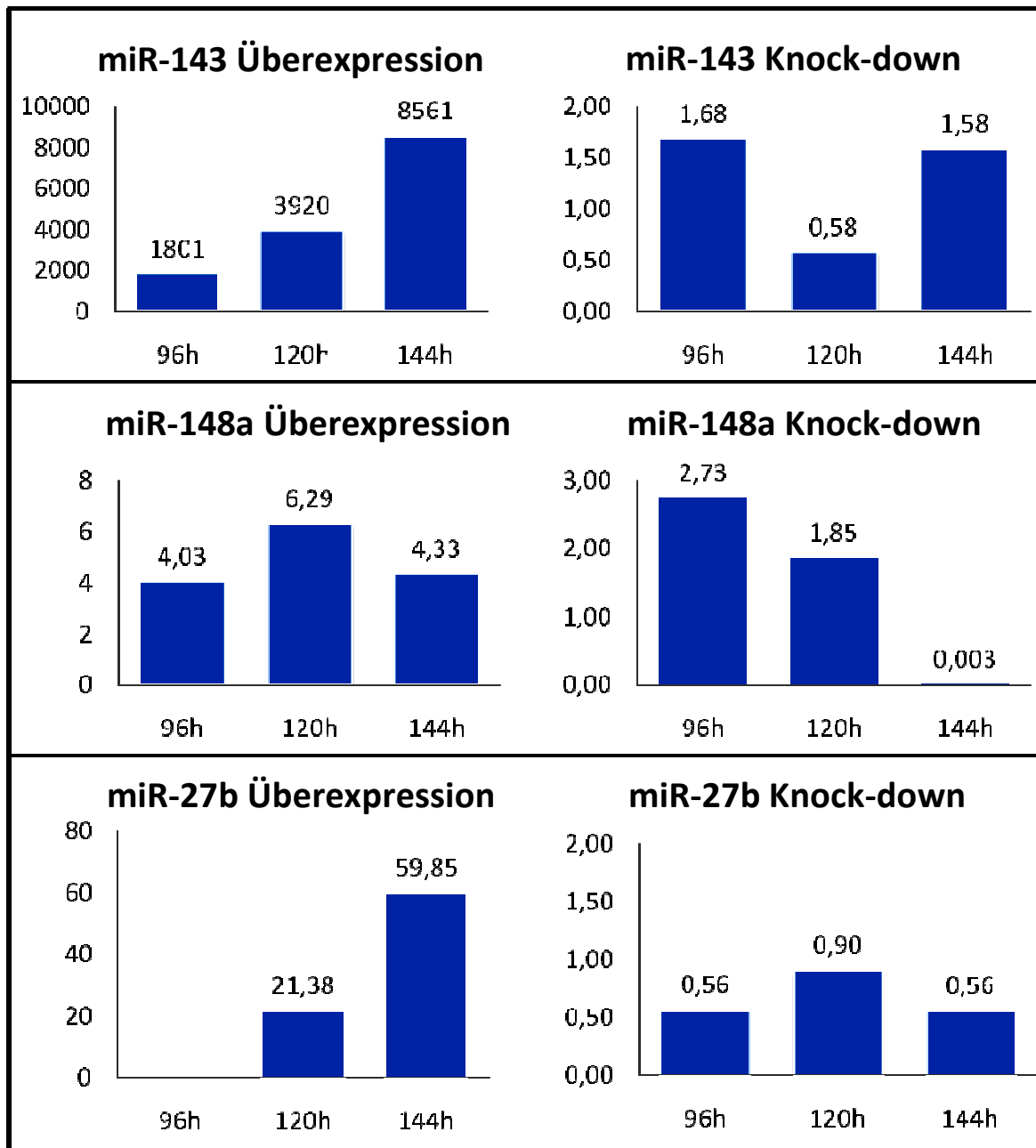


Abbildung 17: MicroRNA Expressionen (n-fach) im Zeitverlauf: gezeigt ist die relative Expression der microRNAs normiert auf die korrespondierende Kontrolle (miMock bzw. pmiRZip K), über eine Zeit von 96h, 120h und 144h, in humanen Hepatozyten, die entweder mit pCDH143, pCDH148a pCDH27b (Überexpression) oder mit pmiRZip143, pmiRZip148a, pmiRZip27b (Knock-down) transfiziert waren.

Die miR-27b erreichte nach 144h die höchste Expression von rund 60-fach und einen Knock-down von 44 %. Somit würde sich 144h nach der Infektion in diesem Fall als bester Zeitpunkt für weitere Analysen anbieten. Jedoch zeigten Aktivitätsmessungen nach 144 h einen erheblichen Verlust der CYP-Aktivitäten, die bis auf 10% der Anfangsaktivität (0h) sanken (siehe Abb. 18). Deshalb sollte ein möglichst früher Zeitpunkt für Experimente gewählt werden. Bis auf CYP2C8 und CYP2C9 schienen alle anderen CYPs an Tag 5 (120h) einen Umsatz ihrer spezifischen Substrate im noch messbaren Bereich zu haben.

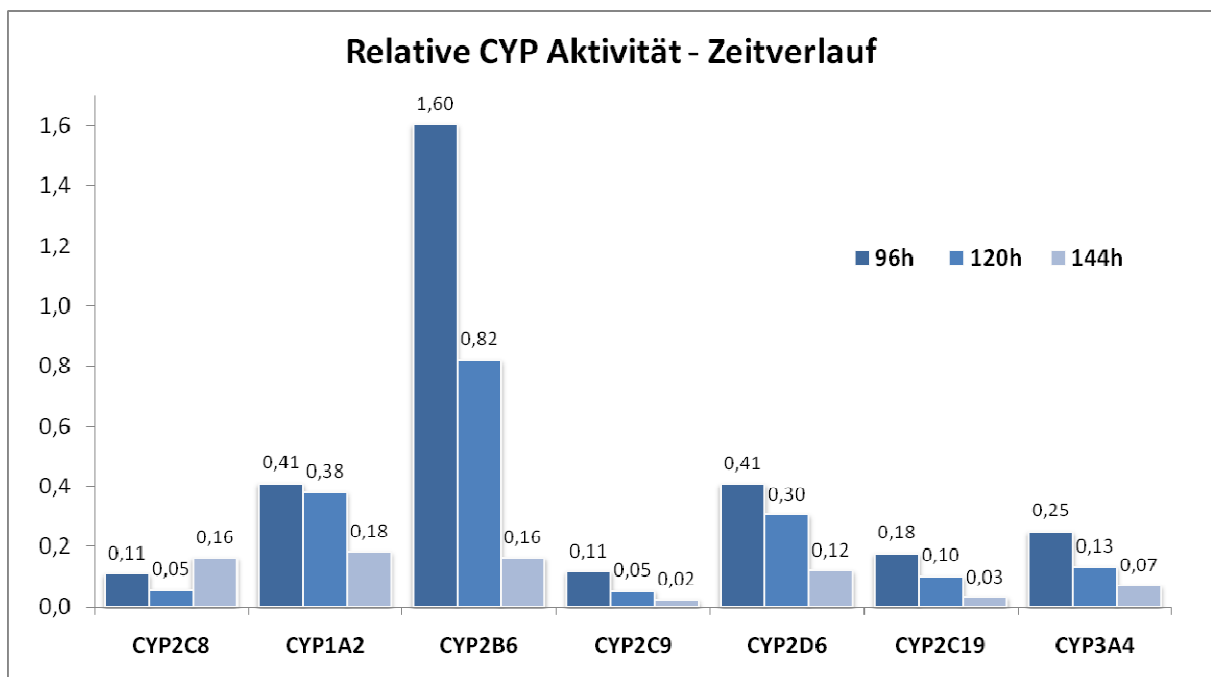


Abbildung 18: CYP Aktivitäten im Zeitverlauf. Die Aktivitäten untersuchter CYPs nach 96h, 120h und 144h bezogen auf den 0h Wert. Gemessen wurden die Aktivitäten im Überstand von Hepatozyten durch Inkubationen mit einem CYP Substrate Mix. Werte sind bezogen auf Anfangsaktivitäten am Tag der Ankunft.

Um in den folgenden Experimenten eine möglichst hohe Expression bzw. starken Knock-down der einzelnen microRNAs und eine noch messbare Aktivität der CYPs zu gewährleisten, wurde 120h nach Infektion als bester Versuchszeitpunkt gewählt. Nach 120h waren alle drei microRNAs, im Gegensatz zur Kontrolle, deutlich höher exprimiert. Der Knock-down war jedoch an allen Zeitpunkten nicht optimal und schwankte stark. Dies führte zu der Annahme, dass der Knock-down möglicherweise nicht durch Expressionsmessungen zuverlässig detektierbar war, da sich durch das Abfangen der microRNAs in den Zellen mittels einer komplementären RNA Sequenz nicht zwangsläufig die microRNA Konzentration, sondern die

Regulationsfähigkeit ändert. Deshalb wurden die microRNA Expressionen des Knock-downs bei der Entscheidung für den optimalen Versuchszeitpunkt als mindergewichtig angesehen.

4.2.3 Kontrollen für die Überexpression und den Knock-down der microRNAs

Um den Knock-down oder die Überexpression von microRNAs funktionell überprüfen zu können, wurden validierte Zielgene aus der Literatur ausgewählt, die eine mRNA Expressionsänderung durch miR-143, miR-148a und miR-27b gezeigt hatten. Für miR-143 bot sich die DNA-Methyltransferase 3A (DNMT3A) (Ng et al., 2009) und für miR-27b die Suppression of tumorigenicity 14 (ST14) an (Wang et al., 2009). Da für miR-148a kein auf mRNA Ebene reguliertes, validiertes Gen beschrieben war, wurde ein Gen ausgewählt, das von miR-148a auf Proteinebene reguliert wird, aber die Möglichkeit bestand, dass eine mRNA Regulation vorhanden sein könnte (DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1)) (Zhu et al., 2011).

Der Versuch wurde wie unter 4.2.2 beschrieben durchgeführt. Nach 120h wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA isoliert. Anschließend wurde die Expression der oben genannten spezifischen Kontrollgene mittels qPCR quantifiziert. Daraus ergaben sich n-fache Änderungen der Kontrollgene, welche als Richtwerte für die Funktionalität des Versuches dienten.

Wie Abbildung 19 zeigt, wurde für miR-143 eine 16%-ige Herunterregulierung in den miR-143 überexprimierenden Hepatozyten und eine 16%-ige Hochregulierung der mRNA Expression in den miR-143 Knock-down Hepatozyten gezeigt. Jedoch waren die Effekte niedriger als erwartet. Für die miR-148a wurde lediglich eine Erhöhung der mRNA Expression von DNMT1 von 24%, aber kein Knock-down gezeigt. Dies könnte zum Einen an der schwachen Überexpression von miR-148a liegen oder an einer möglichen fehlenden Regulation der DNMT1 auf mRNA Ebene durch die miR-148a, welche ja bisher auch nicht beschrieben wurde. In den miR-27b Überexpressionszellen war ein 40%iger Knock-down des Kontrollgens ST14 zu verzeichnen, während eine 34%ige Induktion von ST14 in den miR-27b Knock-down Zellen gemessen wurde. Somit wurde gezeigt, dass miR-27b das Kontrollgen wie erwartet reguliert.



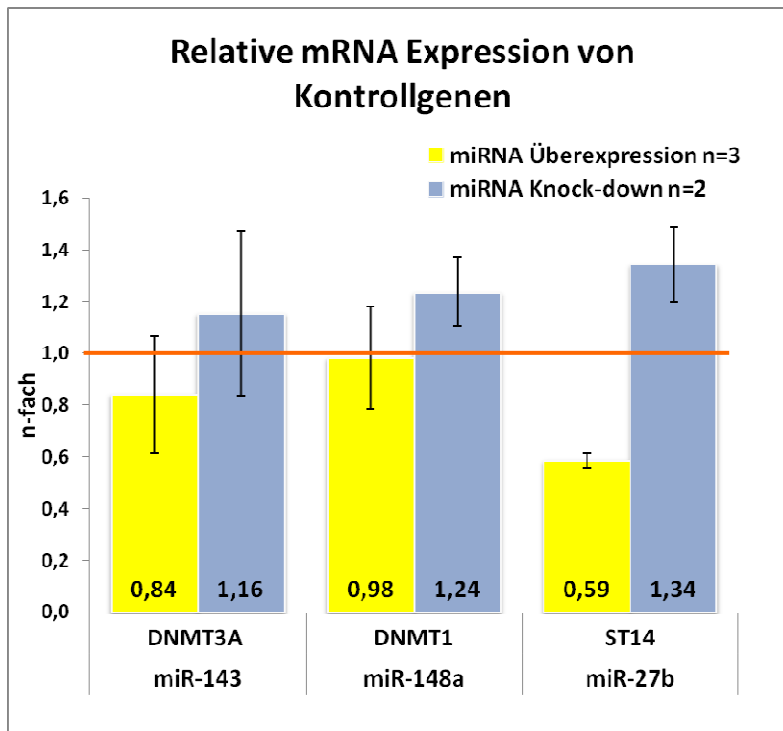


Abbildung 19: mRNA Expression (n-fach) der Kontrollgene für miR-143, miR-148a und miR-27b Überexpressionen und Knock-downs. Dafür wurden validierte Zielgene (DNMT3A, DNMT1 und ST14) für die genannten microRNAs verwendet.

4.2.4 Überexpression und Knock-down der miR-143, miR-148a und miR-27b

Dem Versuchsaufbau von 4.2.2 folgend, wurden zwei weitere Hepatozytenchargen für Überexpressions- und eine weitere für Knock-down Experimente behandelt. Die Lyse erfolgte 120h nach der Infektion. Die mRNA Expression von 45 ADME und 3 Normierungsgenen wurde mit den ADME TaqMan® Array Micro Fluid Cards (Applied Biosystems) quantifiziert. Alle mRNA Expressionsdaten wurden auf GAPDH normalisiert und relativ zur Kontrolle (pCDH-MOCK für Überexpressions- und pmiR-Zip-K für Knock-down- Vektoren) berechnet (Abb. 20-22). Zudem wurde die Protein Expressionen einiger ADME Gene gemessen. Die Werte wurden auf die β -Aktin Expression normiert und relativ zur jeweiligen Kontrolle berechnet. Des Weiteren wurden Aktivitäten für sieben Cytochrom P450 Monooxygenasen mit dem Cocktailassay gemessen. Die Ergebnisse werden im weiteren Verlauf für jede microRNA im Detail erläutert.

4.2.5 Lentivirale miR-143 Überexpression und Knock-down in Hepatozyten

4.2.5.1 mRNA Quantifizierung

Eine Überexpression einer microRNA sollte im klassischen Falle der microRNA Regulation nicht zu einer Beeinflussung der mRNA, sondern zu einer Erniedrigung der Protein Expression führen. Es wurde jedoch gezeigt (siehe Einleitung), dass die mRNA Stabilität durch Bindung einer microRNA herabgesetzt und zum Abbau der mRNA führen kann. Aus diesem Grund könnte eine erniedrigte mRNA Expression eines Gens in Zellen, in denen eine spezielle microRNA überexprimiert wurde, auf einen möglichen regulatorischen Effekt dieser microRNA hindeuten. Diese mRNA sollte dann im Idealfall bei einem Knock-down derselben microRNA zu einer Erhöhung der mRNA führen (siehe 1.1). Auf Abbildung 20 und 21 sind gemittelte relative mRNA Expressionen von 15 für den Arzneimittelstoffwechsel wichtigen CYPs bzw. von 17 Transkriptionsfaktoren dargestellt. Die Expression von weiteren ADME Genen, die durch den ADME Array ermittelt wurden sind im Anhang auf Abbildung 46 zusammengefasst.

Abbildung 20 zeigt die relative Expression von Cytochrom P450 Isoformen, die mit dem ADME Array in den miR-143 Überexpressions- (blaue Balken, oben) und Knock-down (violette Balken, unten) Hepatozyten quantifiziert wurden. Für alle CYPs, außer CYP2D6, CYP2E1 und CYP3A7, wurde in den Hepatozyten, in denen die miR-143 überexprimiert wurde, im Mittel eine Erniedrigung der mRNA von mehr als 20% relativ zur Kontrolle gemessen. Eine erhöhte Expression von über 20% in den miR-143 Knock-down Zellen zeigten lediglich CYP2B6, CYP2C8 und CYP2E1. CYP2C8 zeigte eine über 100%ige und CYP2B6 eine um knapp 70% erhöhte mRNA Expression. Da die Überexpression von miR-143 zu einer erniedrigten und der miR-143 Knock-down zu einer erhöhten CYP2B6 und CYP2C8 mRNA Expression führte, könnte dies auf eine Kontrolle der Genexpression dieser drei Gene durch miR-143 hindeuten.



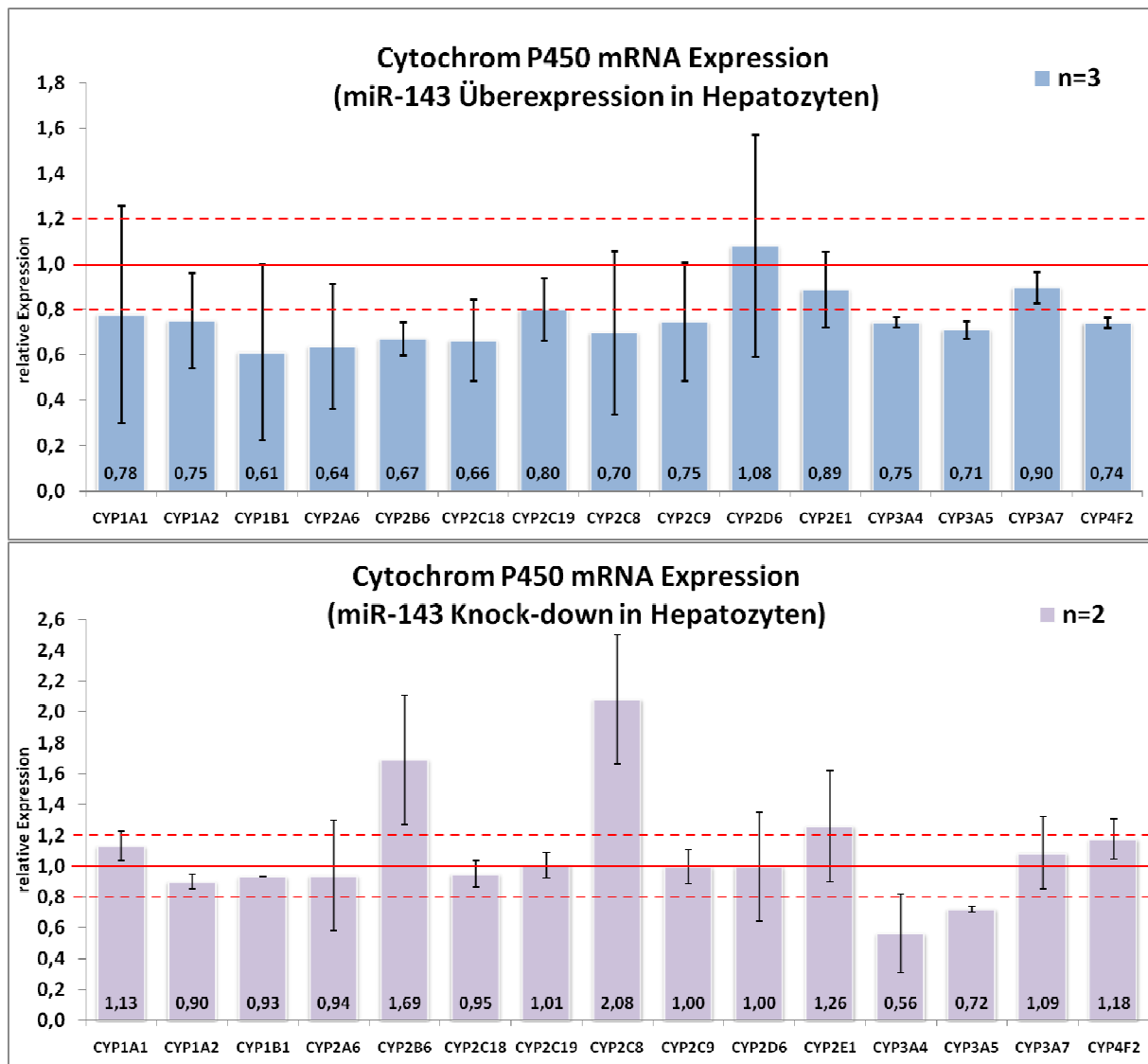


Abbildung 20: Effekt von Überexpression und Knock-down (n-fach) von miR-143 in primären humanen Hepatozyten 120h nach lentiviraler Infektion: Die relative Expression der Cytochrom P450 mRNAs wurde mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode quantifiziert.

Für CYP2C9 wurde eine, um 25% gesenkte mRNA Expression in den miR-143 Überexpressionszellen gezeigt. Jedoch wurde keine erhöhte mRNA Expression in den miR-143 Knock-down Zellen gefunden, ob wohl für CYP2C9 von mehreren Datenbanken eine Bindestelle mit einer hohen Bindungswahrscheinlichkeit für miR-143 vorhergesagt worden war. CYP3A4 zeigte eine um 25% erniedrigte mRNA Expression in den miR-143 Überexpressionszellen. In den miR-143 Knock-down Zellen wurde dieser Effekt noch um weitere 21% verstärkt.

Die Transkriptionsfaktoren (Abb. 21) zeigten sich durch die Überexpression von miR-143 weniger stark beeinflusst. CREBBP, CAR, PPARa und VDR hatten eine um mehr als 20% erniedrigte mRNA Expression. Analog dazu zeigte lediglich CAR eine spiegelbildliche Erhöhung der mRNA Expression in den miR-143 Knock-down Zellen, welche mit 74% erhöhter Expression den stärksten Effekt aufwies. Für CAR wurden jedoch keine miR-143 Bindestellen in der 3'UTR vorhergesagt, womit dieser Effekt möglicherweise indirekt sein könnte.

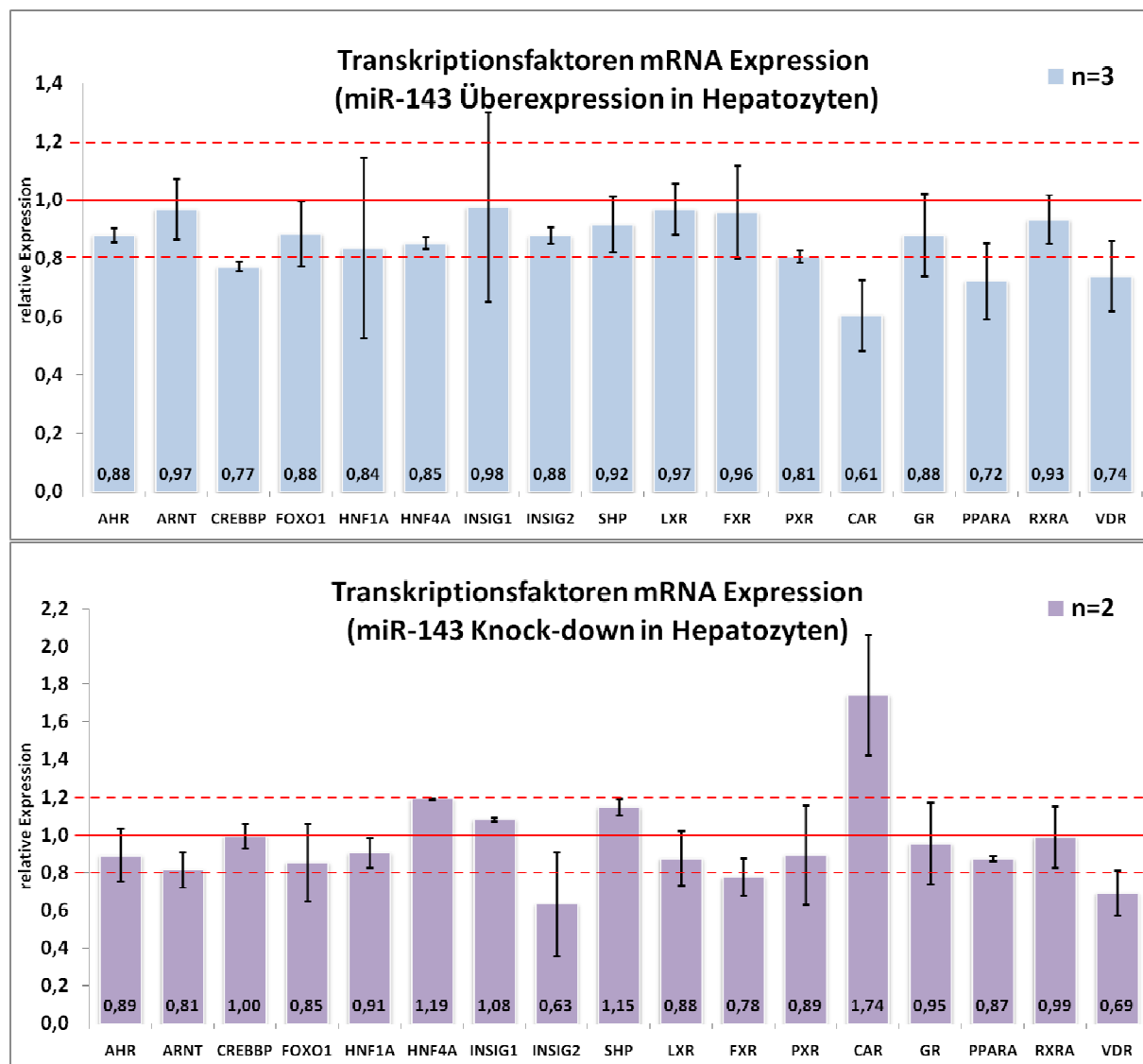


Abbildung 21: Effekt von Überexpression und Knock-down (n-fach) von miR-143 in primären humanen Hepatozyten 120h nach lentiviraler Infektion: Die relative Expression der Transkriptionsfaktoren mRNAs wurde mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode quantifiziert.

Des Weiteren zeigten HNF4a und SHP eine leichte Erhöhung der mRNA Expression in miR-143 Knock-down Zellen. In miR-143 Überexpressionszellen war ein gegenteiliger Effekt, also eine Herunterregulierung der mRNA Expression nur für HNF4a zu erkennen. Dieser betrug zwar nur 15%, könnte aber dennoch ein Hinweis auf eine mögliche Regulation sein, da HNF4a in den Hepatozyten hoch exprimiert ist und deshalb möglicherweise eine höhere microRNA Menge zur Herunterregulierung notwendig ist. HNF4a besitzt eine vorhergesagte Bindestelle für miR-143, wie unter 4.2.1 auf Abbildung 15 gezeigt ist, was eine mögliche Regulation unterstreicht.

4.2.5.2 Proteinexpression

Mittels Westernblot wurde die Proteinexpression von sechs CYPs und drei nukleären Rezeptoren in den miR-143 Überexpressions- und Knock-down Zellen gemessen und relativ zur jeweiligen Kontrolle quantifiziert. Zur Normierung der Daten und als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet.

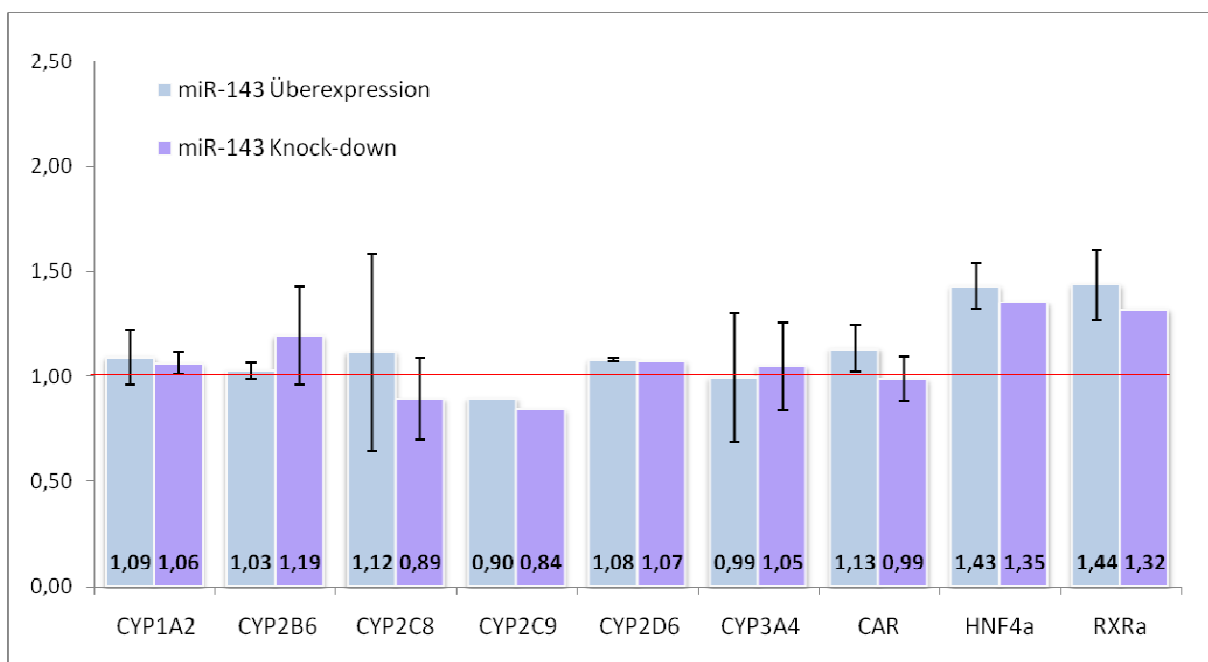


Abbildung 22: Mittels Westernblot bestimmte Protein Expressionen (n-fach) von ausgewählten ADME Genen. Normalisiert auf β -Aktin und auf die jeweilige Kontrolle.

Abbildung 22 zeigt die ermittelten Proteinexpressionen für die oben genannten Gene. Die Proteinwerte für CYP2C8 und CAR zeigten, im Gegensatz zu den mRNA Daten, weniger starke Effekte. Es konnte sogar ein leicht gegenläufiger Trend beobachtet werden. Für HNF4a und RXRa war eine mehr als 20%-ige Änderung zu sehen, welche sich allerdings in beiden Behandlungen, sowohl miR-143 Überexpression, als auch Knock-down, zeigte. Eine Erhöhung der Expression von HNF4a und RXRa in den miR-143 Knock-down Zellen wurde auch zuvor auf mRNA Ebene beobachtet

4.2.5.3 Cytochrom P450 Aktivitäten

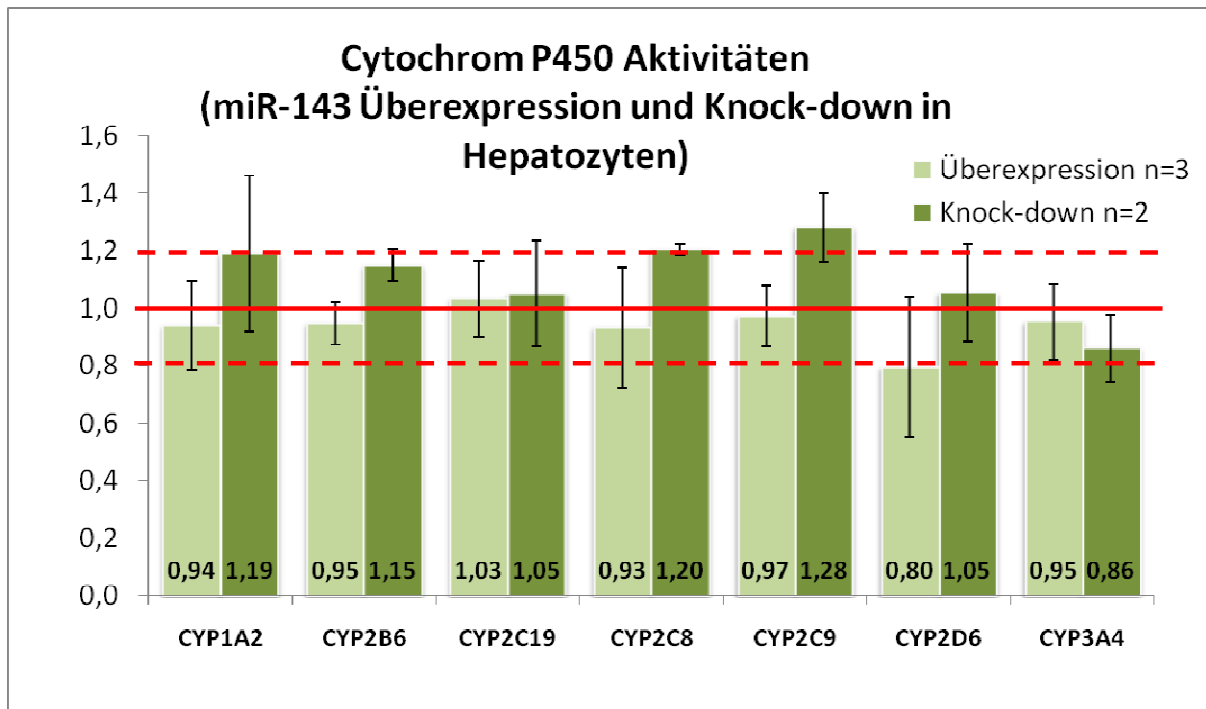


Abbildung 23: CYP Aktivitäten (n-fach) der miR-143 Überexpression und Knock-down primären humanen Hepatozyten. Messung im Überstand mit dem Cocktail-Assay .

Die Aktivität von sieben CYPs wurde, wie unter 3.7 näher erläutert, mittels LC-MS an Tag 5 im Überstand der Hepatozyten bestimmt. Auf Aktivitätsebene zeigten sich, im Vergleich zu den mRNA Daten, nur schwache regulatorische Effekte der miR-143 auf die sieben Cytochrom P450 Gene. CYP2B6 und CYP2C8, welche auf mRNA Ebene deutlich höhere Expressionen in den miR-143 Überexpressions-, bzw. niedrigere Expressionen in den miR-

143 Knock-down Zellen aufwies, zeigten eine leichte Tendenz in dieselbe Richtung, aber keine signifikanten Änderungen (siehe Abb. 23). Auch die anderen CYPs wiesen kaum Unterschiede in ihren spezifischen Aktivitäten auf. Auffällig war, dass CYP3A4 in den miR-143 Knock-down Zellen eine erniedrigte Aktivität aufwies, was mit der mRNA Expression übereinstimmte.

4.2.5.4 Zusammenfassung der miR-143 Ergebnisse

Abbildung 24 zeigt für die für sieben CYPs und drei nukleäre Rezeptoren die oben ermittelten mRNA, Protein und Aktivitätsdaten in einer komprimierten Darstellung. Dabei werden sowohl die miR-143 Überexpressionen (links), als auch die miR-143 Knock-down Experimente (rechts) gezeigt.

	miR-143 Überexpression			miR-143 knock down		
	mRNA	Prot.	Aktiv.	mRNA	Prot.	Aktiv.
CYP1A2	0,75	1,09	0,94	0,9	1,06	1,19
CYP2B6	0,67	1,03	0,95	1,69	1,19	1,15
CYP2C8	0,7	1,12	0,8	2,08	0,89	1,2
CYP2C9	0,75	0,9	0,97	1	0,84	1,28
CYP2C19	0,8		1,03	1,01		1,05
CYP2D6	1,08	1,08	0,8	1	1,07	1,05
CYP3A4	0,75	0,99	0,95	0,56	1,05	0,86
CAR	0,61	1,13		2,17	0,99	
HNF4a	0,85	1,43		1,51	1,35	
RXRa	0,93	1,44		1,23	1,32	

Abbildung 24: Zusammengefasste Ergebnisse für mRNA, Protein und Aktivität der miR-143 Überexpression und des Knock-downs für zehn ausgewählte Gene in Heatmap Darstellung. Eine Abnahme der Expression/Aktivität ist in grün und eine Erhöhung der Expression/Aktivität in rot dargestellt.

Auf mRNA Ebene waren insgesamt die stärksten Effekte zu verzeichnen, die sich zum Teil auch deutlich von den Änderungen in der Proteinexpressionen unterschieden. Auch gab es unterschiede zwischen Proteinexpressionen und den dazugehörigen Aktivitäten. Konsistente Ergebnisse zeigte dabei vor allem CYP2B6 in den miR-143 Knock-down Experimenten, da auf

allen drei Ebenen eine erhöhte Expression bzw. Aktivität zu sehen war. HNF4a und auch RXRa wiesen in den Knock-Down Experimenten sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene erhöhte Expressionen auf.

Auch für CYP2C8 war abgesehen von den Proteinwerten eine erniedrigte Expression in den miR-143 Überexpressionszellen, als auch eine Erhöhung in den miR-143 Knock-down Zellen zu sehen. Deshalb wurde eine direkte Bindung von miR-143 an die CYP2C8 3'UTR mittels Reportergergen Assays überprüft. Mögliche fehlende Übereinstimmung zwischen Protein und Aktivität oder der mRNA könnte eventuell auf die jeweilige Messmethode zurückzuführen sein. Quantifizierung über Westernblot ist im Vergleich zu mRNA oder Aktivitätsquantifizierung eine weniger sensitive Methode, die je nach Antikörperspezifität variieren kann und leichte Veränderungen der Expression nur selten eindeutig quantifizierbar sind.

4.2.5.5 Validierung für miR-143 mittels Reportergergen Assay für CYP2C8 und CYP3A4

Zur Validierung wurden für CYP2C8 und CYP3A4 exemplarisch Reportergergen Assays gemacht. Die 3'UTR der jeweiligen Gene wurden wie unter 3.3 beschrieben hinter das Stop Kodon eines Luciferasegens (Renilla) kloniert. Anschließend wurden diese Vektoren mit den microRNA Expressions- oder Knock-down Vektoren in HEK293 Zellen kotransfiziert, nach zwei Tagen lysiert und gemessen. Die Menge des Reporters betrug 200 ng und die Vektoren für die microRNAs 800 ng bzw. 500 ng. Die Kontrolle war, analog zu den Hepatozyten Experimenten, entweder miMock oder pmirZip und wurde im selben Verhältnis eingesetzt.

Die Ergebnisse der Luciferase Messungen sind in Abbildung 25 gezeigt. Für CYP2C8 wurden, sowohl nach Kotransfektion des miR-143 Expressions-Vektors, als auch des miR-143 Knock-down Vektors, keine nennenswerte Änderung der Luminiszenz beobachtet. In den oben gezeigten Experimenten waren für CYP2C8 starke Effekte gezeigt worden, die hier nicht reproduziert werden konnten, was ein Hinweis auf eine indirekte Regulation von CYP2C8 durch die miR-143 sein könnte. Die Reportergergen-Analysen der CYP3A4 3'-UTR hingegen spiegelte die auch schon in den Hepatozyten gesehenen Effekte wieder.

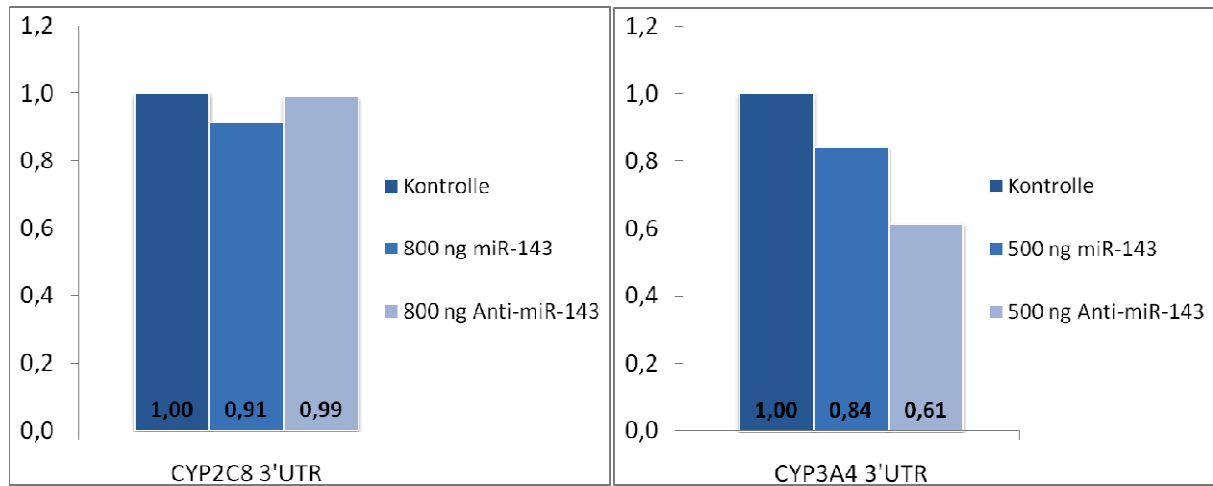


Abbildung 25: Reporter gen Assays der CYP2C8 3'UTR in pmiRGLO und CYP3A4 3'UTR in pmiRGLO kotransfiziert mit pCDH143 oder pmiRZIP143.

4.2.6 Lentivirale miR-148a Überexpression und Knock-down in Hepatozyten

4.2.6.1 mRNA Quantifizierung

MiR-148a wurde ausgewählt, da sie in der Literatur als PXR regulierende microRNA von (Takagi et al., 2008) beschrieben wurde. Eine Überexpression oder ein Knock-down der miR-148a sollte daher einen Einfluss auf die PXR Proteinexpression und auch auf die CYP3A4 mRNA bzw. Protein Expression zur Folge haben.

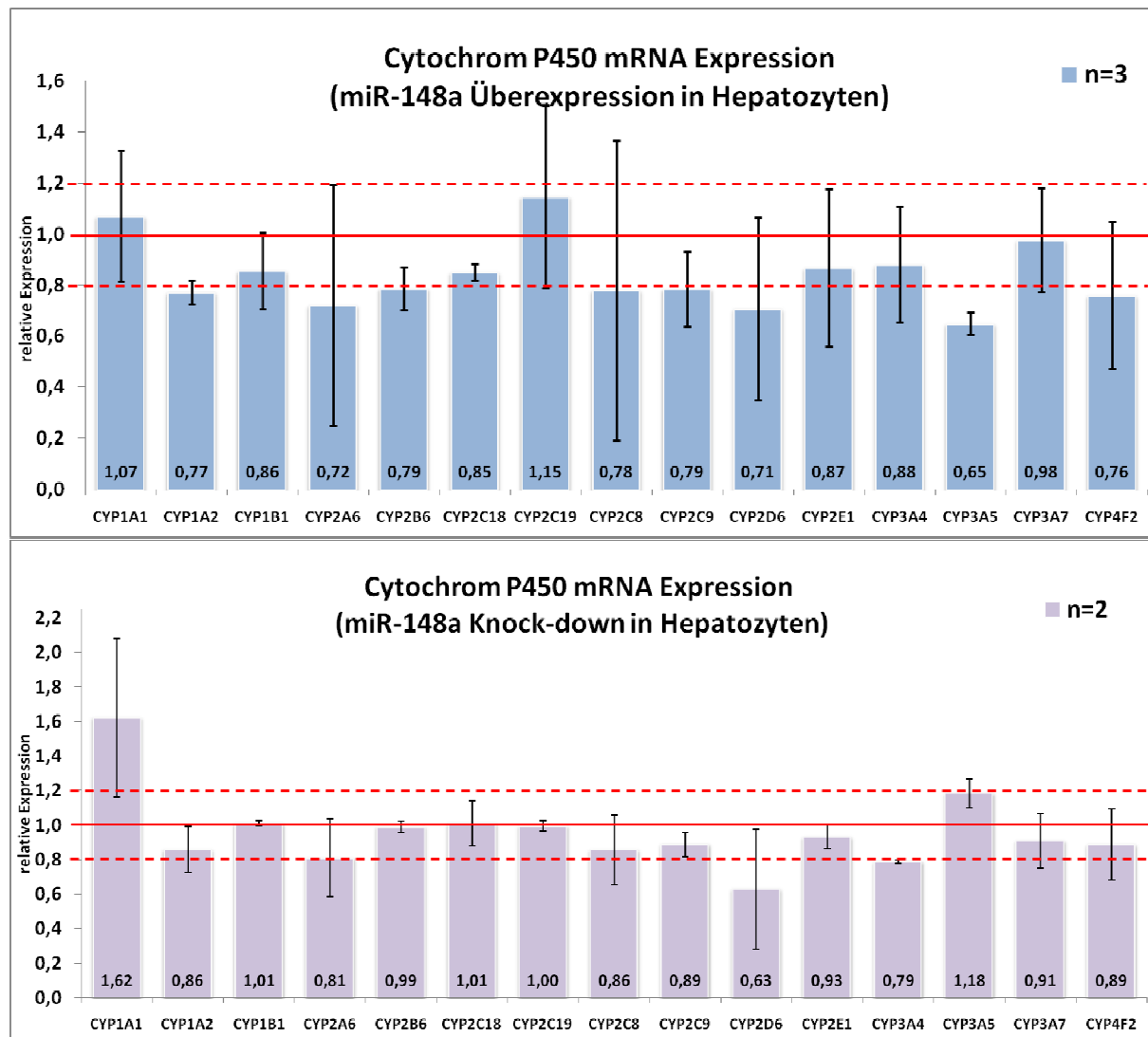


Abbildung 26: Effekt von Überexpression und Knock-down (n-fach) von miR-148a in primären humanen Hepatozyten 120h nach lentiviraler Infektion: Die relative Expression der Cytochrom P450 mRNAs wurde mittels $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ Methode quantifiziert.

Die in Abbildung 26 gezeigten relativen mRNA Expressionen zeigt eine leichte Abnahme um 12% für CYP3A4 bei miR-148a Überexpression. Der Knock-down von miR-148a zeigte

allerdings nicht den erwarteten Anstieg der CYP3A4 mRNA Expression. CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A5 und CYP4F2 zeigten eine um 20% erniedrigte mRNA Expression bei miR-148a Überexpression. Im Knock-down Experiment wurde, außer für CYP1A1 mit einer Erhöhung von 62%, keine wesentliche Steigerung der CYP mRNAs beobachtet. CYP2D6 zeigte nach miR-148a Knock-down eine deutlich erniedrigte Expression (37%).

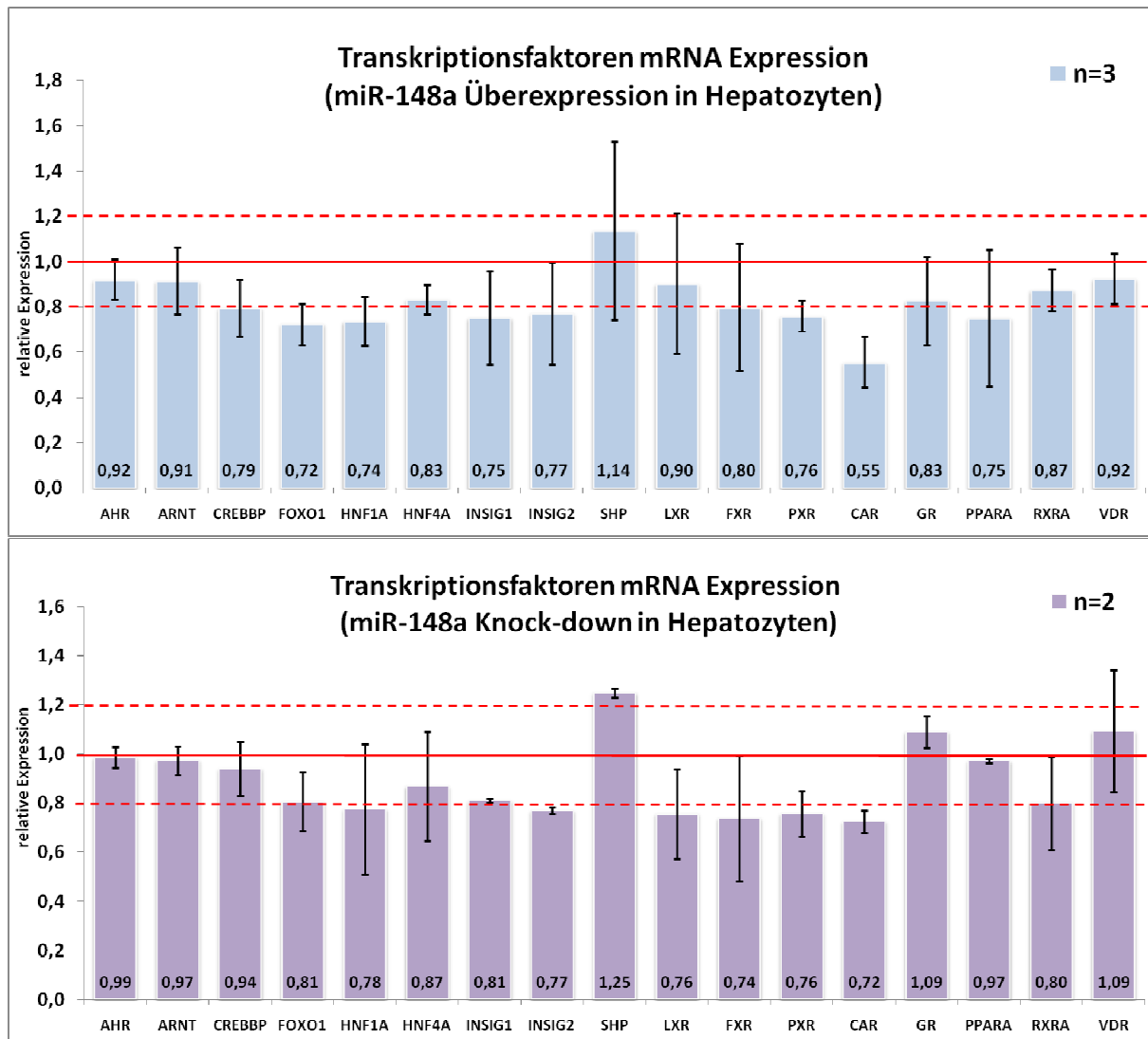


Abbildung 27: Effekt von Überexpression und Knock-down (n-fach) von miR-148a in primären humanen Hepatozyten 120h nach lentiviraler Infektion: Die relative Expression der Transkriptionsfaktoren mRNAs wurde mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode quantifiziert.

In Abbildung 27 ist die mRNA Expression der Transkriptionsfaktoren bei miR-148a Überexpression und Knock-down von miR-148a gezeigt. SHP zeigte in den Knock-down Hepatozyten einen Anstieg der mRNA Expression von mehr als 20%. Die Expression in den Überexpressionszellen war für CREBP, FOXO1, HNF1a, HNF4a, INSIG1, INSIG2, FXR, PXR CAR und PPARa deutlich erniedrigt (<20%). Für diese Faktoren wurde keine erhöhte mRNA Expression nach miR-148a Knock-down gefunden.

4.2.6.2 Proteinexpression

Abbildung 28 zeigt die Proteinexpression für die oben beschriebenen Experimente. CYP2C8, HNF4a und RXRa wiesen in den miR-148a Überexpressionszellen eine Erhöhung der Proteinexpression um mehr als 20% auf. CYP2D6 zeigte, wie zuvor auf mRNA Ebene beobachtet, eine Erniedrigung der Expression um 14% in den miR-148a Knock-down Zellen. Für CYP3A4 wurden, analog zu den mRNA Daten, keine signifikanten Änderungen gefunden, lediglich ein leichter Trend könnte in den miR-148a Knock-down Zellen auf eine mögliche höhere Expression hindeuten.

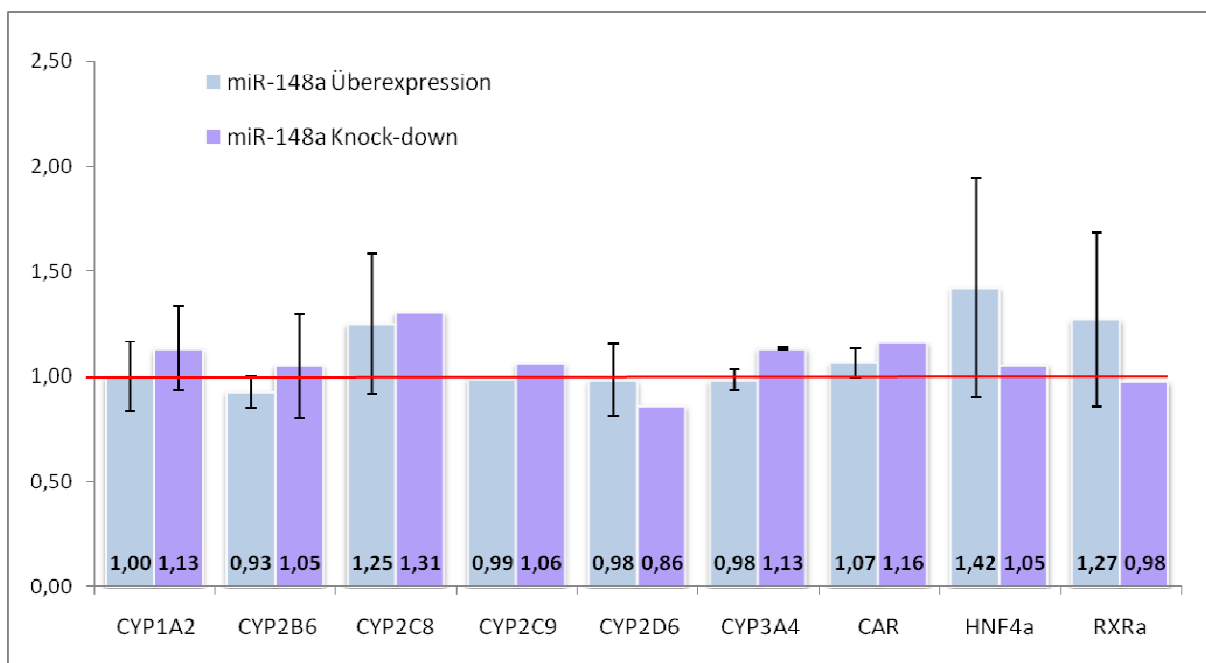


Abbildung 28: Mittels Westernblot bestimmte Protein-Expression ausgewählter ADME Gen. Normalisiert auf β -Aktin und auf die jeweilige Kontrolle.

4.2.6.3 Cytochrom P450 Aktivitäten

Die CYP Aktivitäten (siehe Abb. 29) zeigten nur leichte Änderungen im Falle von CYP3A4. Für CYP1A2 und CYP2D6 war in den Überexpressionszellen eine Abnahme der Aktivität um 26% (CYP1A2) und 32% (CYP2D6) zu verzeichnen, was für CYP2D6 auch schon auf mRNA Ebene zu sehen war, jedoch auf Proteinebene nicht gezeigt werden konnte. Für CYP1A2 konnte der Effekt weder auf mRNA, noch auf Proteinebene bestätigt werden. Im Falle von miR-148a Knock-down Zellen hatten CYP2C19, CYP2C8 und CYP3A4 verminderte Aktivität. Dies stimmte mit der mRNA Expression für CYP2C8 und CYP3A4 überein.

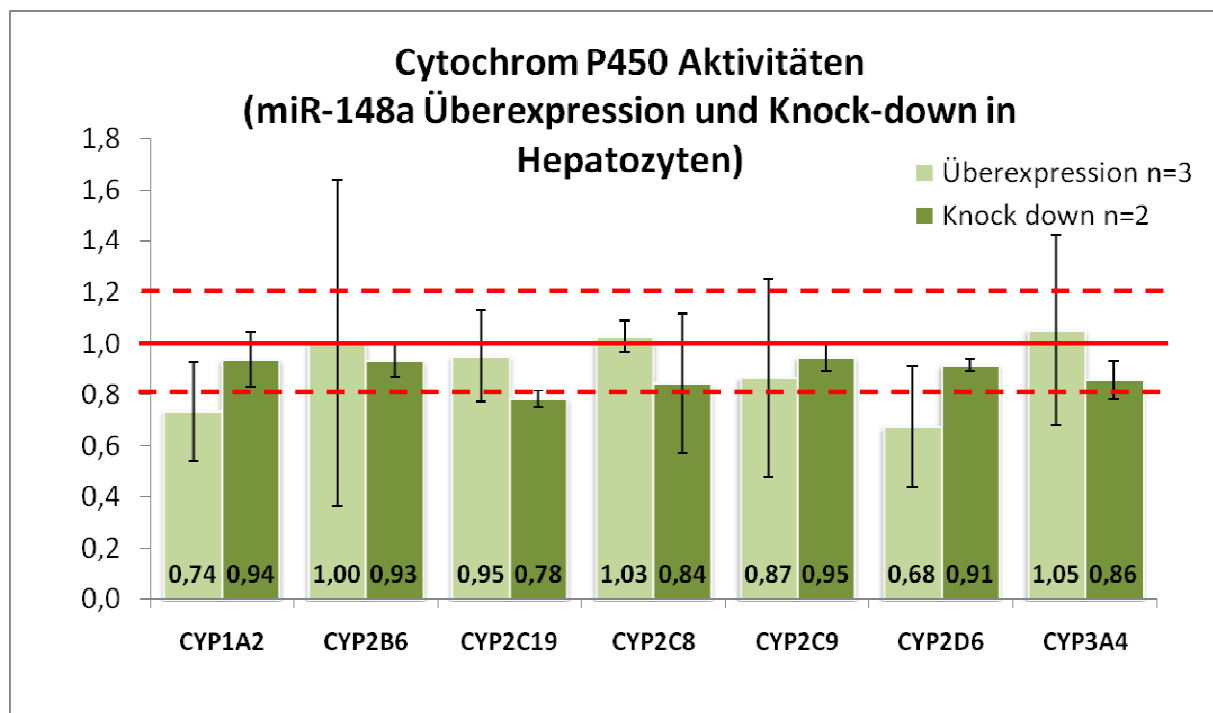


Abbildung 29: CYP Aktivitäten der miR-148a Überexpression (n=3) und Knock-down (n=2) primären humanen Hepatozyten. Messung im Überstand mit dem Cocktail-Assay nach Feidt et al., 2010.

4.2.6.4 Zusammenfassung der miR-148a Ergebnisse

Wie für miR-143 zeigten sich auch hier nur selten konsistente Zusammenhänge von mRNA, Protein und Aktivität (Abb. 30). Die gefundenen Änderungen waren geringer als bei miR-143, was vermutlich auf die weniger starke Überexpression im Fall von miR-148a zurückzuführen war (siehe 4.2.2).

	miR-148a Überexpression			miR-148a knock down		
	mRNA	Prot.	Aktiv.	mRNA	Prot.	Aktiv.
CYP1A2	1,07	1	0,74	1,62	1,13	0,93
CYP2B6	0,79	0,93	1	0,99	1,05	0,93
CYP2C8	0,78	1,25	1,03	0,86	1,31	0,84
CYP2C9	0,79	0,99	0,87	0,89	1,06	0,95
CYP2C19	1,15		0,95	1		0,78
CYP2D6	0,71	0,98	0,68	0,63	0,86	0,91
CYP3A4	0,88	0,98	1,05	0,79	1,13	0,86
CAR	0,55	1,07		1,18	1,16	
HNF4a	0,83	1,42		1,37	1,05	
RXRa	0,87	1,27		1,27	0,98	

Abbildung 30: Zusammengefasste mRNA, Protein und Aktivität Ergebnisse der miR-148a Überexpression und des Knock-downs für zehn ausgewählte Gene. Eine Abnahme der Expression/Aktivität ist in grün und eine Erhöhung der Expression/Aktivität in blau dargestellt.

4.2.6.5 Validierung für miR-148a mittels Reporteragen Assay für CYP2C8 und CYP3A4

Entsprechend zu 4.2.5.5 wurde die 3'UTR Region von CYP2C8 und CYP3A4 im Reporteragenassay analysiert. Die hier erhaltenen Ergebnisse spiegelten sowohl für CYP2C8 als auch CYP3A4 die oben gezeigten Aktivitätsdaten wieder. Es zeigte sich ein leichter Anstieg nach Kotransfektion der miR-148a und eine Abnahme nach Knock-down der miR-148a. Eine Validierung der Daten in diesem artifiziiellen System war in diesem Fall möglich.

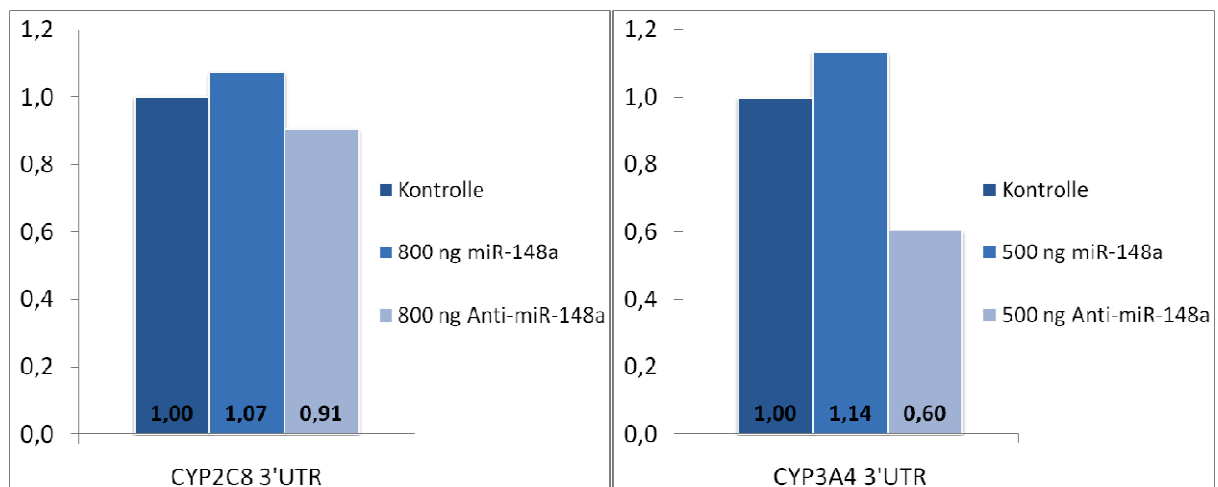


Abbildung 31: Reporteragen Assays der CYP2C8 3'UTR und CYP3A4 3'UTR im pmiRGLO Vektor kotransfiziert mit pCDH148a oder pmiRZIP148a.

4.2.7 Lentivirale miR-27b Überexpression und Knock-down in Hepatozyten

4.2.7.1 mRNA Quantifizierung

CYP3A4 ist ein direktes und indirektes Zielgen der miR-27b (Pan et al., 2009). Um dies zu untersuchen und weitere Zielgene zu finden wurden Überexpressions- und Knock-down Experimente von miR-27b in primären humanen Hepatozyten durchgeführt (Abb. 32).

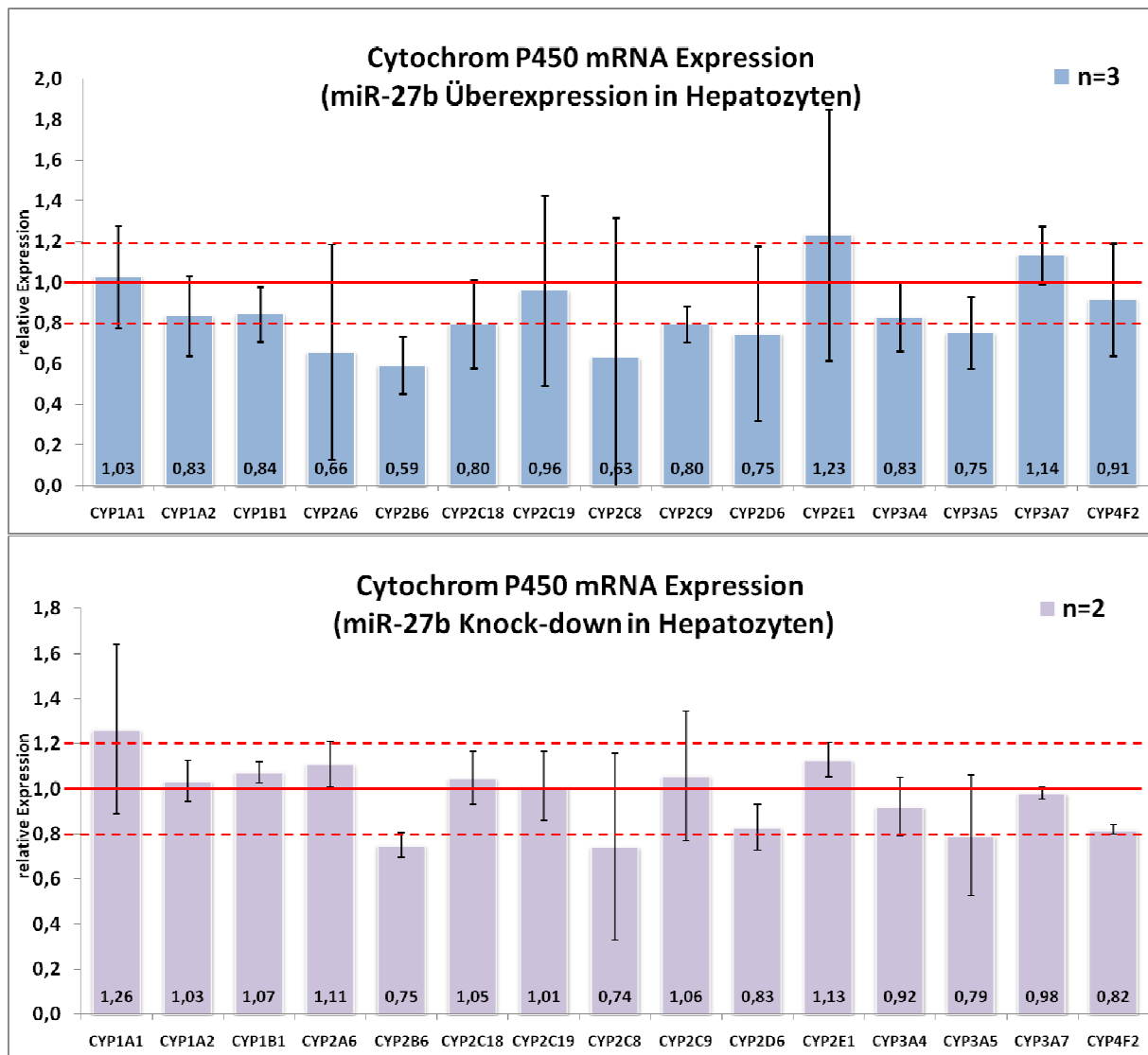


Abbildung 32: Effekt von Überexpression und Knock-down (n-fach) von miR-27b in primären humanen Hepatozyten 120h nach lentiviraler Infektion: Die relative Expression der Cytochrom P450 mRNAs wurde mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode quantifiziert.

CYP3A4 zeigte bei miR-27b Überexpression eine leichte Erniedrigung der mRNA Expression, jedoch keine Erhöhung der mRNA Expression in den miR-27b Knock-down Zellen. CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 und CYP3A5 wiesen eine erniedrigte mRNA Expression um mehr als 20% in den Zellen auf, die miR-27b überexprimierten.

Eine erhöhte mRNA Expression in den miR-27b Knock-down Zellen war allerdings nur für CYP1A1 zu erkennen. Die von (Tsuchiya et al., 2006) publizierte Regulation von CYP1B1 durch die miR-27b wurde durch eine Abnahme der mRNA Expression um 16% nach miR-27b Überexpression und eine Zunahme von 7% in den miR-27b Knock-down Zellen tendenziell bestätigt.

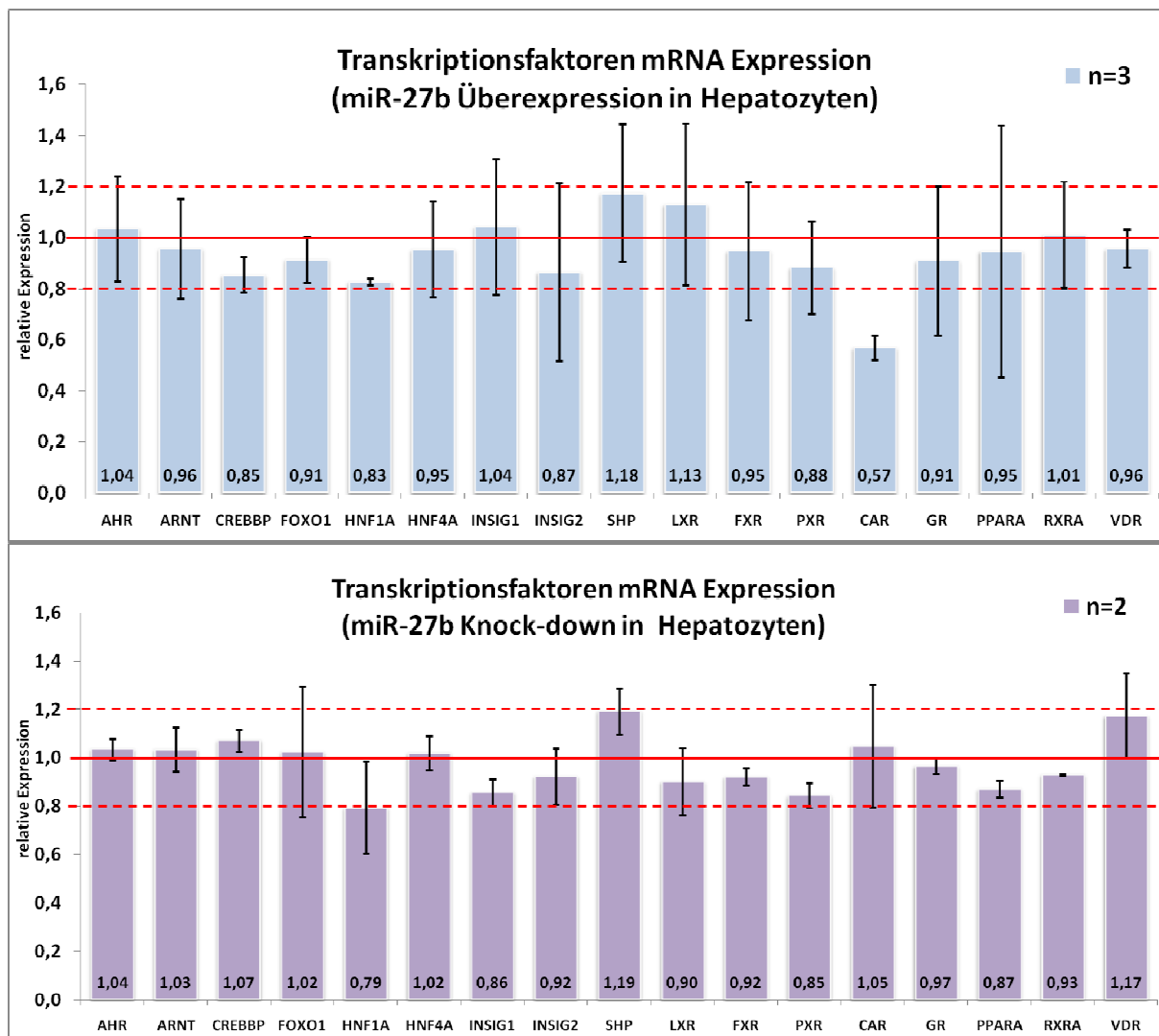


Abbildung 33: Effekt von Überexpression und Knock-down (n-fach) von miR-27b in primären humanen Hepatozyten 120h nach lentiviraler Infektion: Die relative Expression der Transkriptionsfaktoren mRNAs wurde mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode quantifiziert.

Die mRNA Expressionen der nukleären Rezeptoren (Abb. 33) zeigten nur für CAR einen Knock-down von über 20% bei miR-27b Überexpression, während alle anderen Faktoren lediglich geringfügig erniedrigt waren. Beim Knock-down von miR-27b waren keine deutlichen Änderungen der mRNA Expression messbar.

4.2.7.2 Proteinexpression

Die Proteinexpressionen verhielten sich im Vergleich zur mRNA ähnlich. Zudem wurde für CYP3A4 eine Überexpression um 22% in den miR-27b Knock-down Zellen gefunden. CYP2C8, CYP2C9 und CYP2D6 waren durch den Knock-down von miR-27b in der Proteinexpression um mehr als 20% gestiegen. Die nukleären Rezeptoren HNF4a und RXRa zeigten hier keine Änderung der Expression, was eine mögliche transkriptionelle Regulation der zuvor genannten CYPs möglicherweise ausschließt.

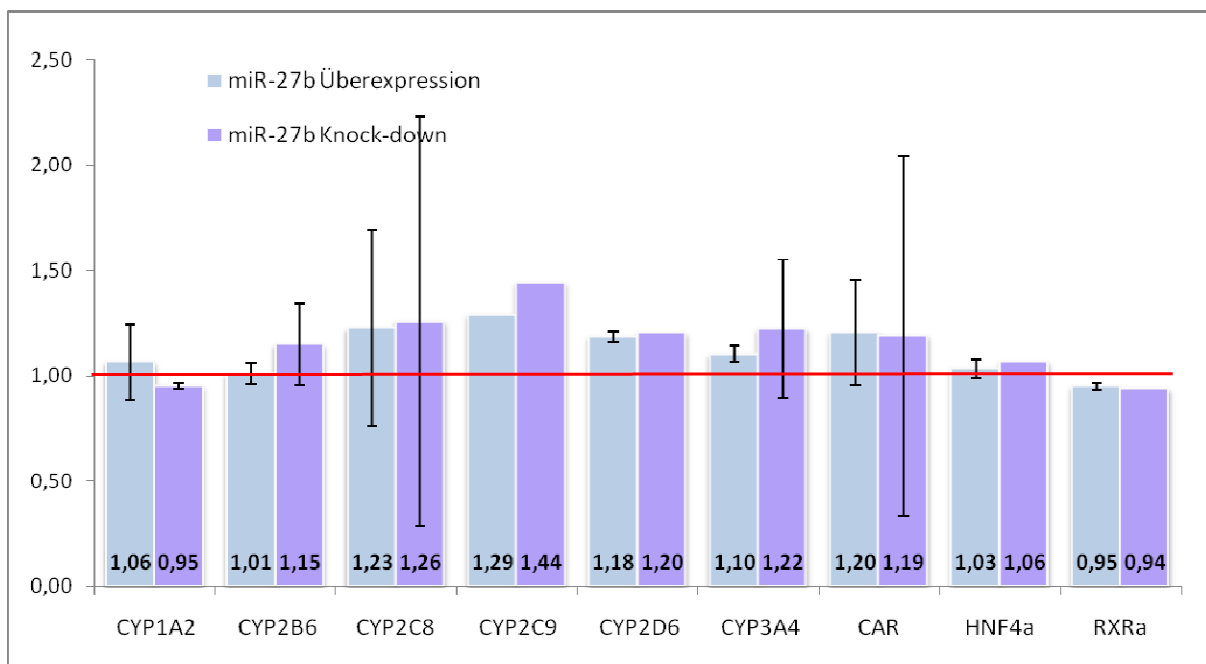


Abbildung 34: Mittels Westernblot bestimmte Protein Expressionen von ausgewählten ADME Genen. Normalisiert auf β -Aktin und auf die jeweilige Kontrolle.

4.2.7.3 Cytochrom P450 Aktivitäten

In Abbildung 35 sind im Überstand gemessene Cytochrom P450 Aktivitäten in den miR-27b Überexpressions- und Knock-down Zellen dargestellt. Eine Überexpression der miR-27b bewirkte für keine der sieben Cytochrom P450 Enzyme eine deutliche Erniedrigung der Aktivität. CYP3A4 zeigte sogar eine um 20% erhöhte Aktivität nach miR-27b Überexpression und eine um 22% erniedrigte Aktivität in den miR-27b Knock-down Zellen. Diese Ergebnisse widersprechen der mRNA Expressionen bzw. der Literatur.

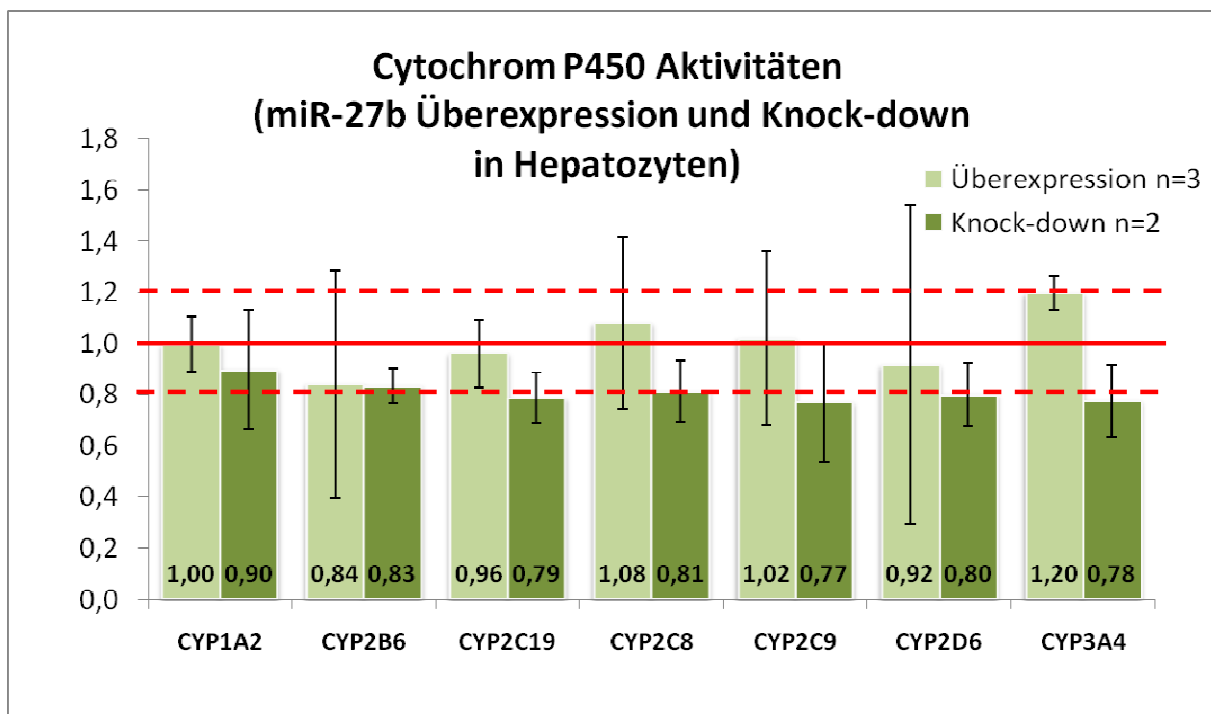


Abbildung 35: CYP Aktivitäten der miR-27b Überexpression (n=3) und Knock-down (n=2) primären humanen Hepatozyten. Messung im Überstand mit dem Cocktailassay.

4.2.7.4 Zusammenfassung der miR-27b Ergebnisse

Auch für miR27b sind wiederum die Proteindaten und mRNA/Aktivität nicht übereinstimmend (Abb. 36). Jedoch wurde eine gute Korrelation von Aktivität und der mRNA Daten erhalten.

	miR-27b Überexpression			miR-27b knock down		
	mRNA	Prot.	Aktiv.	mRNA	Prot.	Aktiv.
CYP1A2	0,83	1,06	1	1,03	0,95	0,9
CYP2B6	0,59	1,01	0,84	0,75	1,15	0,83
CYP2C8	0,63	1,23	1,08	0,74	1,26	0,81
CYP2C9	0,8	1,29	1,02	1,06	1,44	0,77
CYP2C19	0,96		0,96	1,01		0,79
CYP2D6	0,75	1,18	0,92	0,83	1,2	0,8
CYP3A4	0,83	1,1	1,2	0,92	1,22	0,78
CAR	0,57	1,2		1,05	1,19	
HNF4a	0,95	1,03		1,02	1,06	
RXRa	1,01	0,95		0,93	0,94	

Abbildung 36: Zusammengefasste mRNA, Protein und Aktivität Ergebnisse der miR-27b Überexpression und des Knock-downs für zehn ausgewählte Gene. Eine Abnahme der Expression/Aktivität ist in grün und eine Erhöhung der Expression/Aktivität in blau dargestellt.

4.2.7.5 Validierung für miR-27b mittels Reporteragen Assay für CYP2C8 und CYP3A4

In Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Reporteragenassay für die 3'UTRs von CYP2C8 und CYP3A4 gezeigt. Eine deutliche Übereinstimmung der CYP2C8 Aktivitäten und der Luciferase Ergebnisse konnte bestätigt werden. Für CYP3A4 allerdings konnte der beschriebene Effekt im Reporteragenassay gefunden werden. In den Hepatozyten Experimenten konnte dies jedoch nicht entsprechend gezeigt werden.

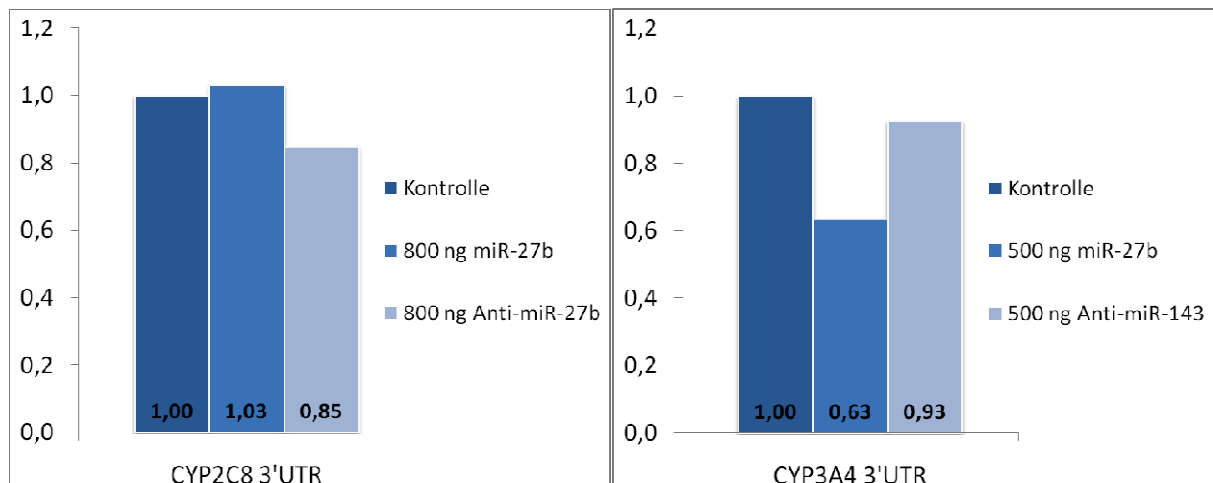


Abbildung 37: Reporteragen Assays der CYP2C8 3'UTR und CYP3A4 3'UTR im pmiRGLO Vektor kotransfiziert mit pCDH27b oder pmiRZIP27b.

4.3 Herunterregulierung und Agonistenbehandlung von CAR in primären humanen Hepatozyten mit lentiviralen shRNA Vektoren

Mit den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob der nukleäre Rezeptor CAR an der Regulation von miRNAs beteiligt ist. Dazu wurde einerseits mit spezifischen shRNAs (C1, C2) CAR herunterreguliert bzw. mit spezifischen Agonisten (CITCO) eine Aktivierung von CAR erzielt. Des Weiteren wurde der CAR Knock-down mit der CITCO Behandlung kombiniert. Die Versuche wurde analog zu den unter 4.2 beschriebenen Versuchen durchgeführt, wobei anstelle der microRNAs die spezifischen shRNAs gegen CAR lentiviral in die primären humanen Hepatozyten transduziert wurden. Anschließend wurde die mRNA und Protein Expression von bestimmten ADME Genen bestimmt, um zum Einen den Knock-down von CAR durch die shRNA und zum Anderen durch einen CAR Knock-down oder eine Induktion hervorgerufener Effekt auf potenzielle, von CAR regulierter Gene, zu überprüfen. Des Weiteren wurde die microRNA Expression von 380 verschiedenen microRNAs in den Hepatozyten mit TaqMan® Array Micro Fluid Cards A v 2.0 ermittelt, um mögliche Regulationen durch CAR zu identifizieren.

4.3.1 Knock-down von CAR und Behandlung mit einem spezifischen CAR Agonist (CITCO) in humanen Hepatozyten

Die Hepatozyten wurden an Tag 0 (Tag der Ankunft) mit lentiviralen Partikel die shRNAs C1 und C2 enthielten, infiziert. Die shRNAs C1 und C2 wurden zum Knock-down von CAR von Benjamin A. Kandel (IKP-Stuttgart) entworfen, kloniert und auf ihre Funktionalität überprüft. C2 war im Knock-down effizienter als C1 und wurde daher in den folgenden Experimenten verwendet. Für die Kombination eines CAR Knock-downs und anschließender Induktion von CAR durch CITCO wurde 96h nach der Infektion der shRNA C2 eine Behandlung mit 1 μ M CITCO für 24 h durchgeführt. Parallel wurden die Zellen desselben Donors ebenfalls für 24h mit 1 μ M CITCO behandelt jedoch ohne eine vorherige Infektion. Als Kontrollen wurden die Hepatozyten unter identischen Bedingungen kultiviert bzw. mit der Kontroll-shRNA DF9 infiziert bzw. nach 96h mit 1% DMSO (Lösungsmittel von CITCO) für 24h behandelt. An Tag 5 (120h) wurden alle Zellen mit dem miRVana Kit von Ambion lysiert und Protein bzw. RNA isoliert.

4.3.1.1 Quantifizierung der mRNA

Ausgehend von der isolierten RNA wurde für die mRNA Quantifizierung eine cDNA Synthese durchgeführt und mit dem ADME Array die Expression von 48 Genen ermittelt. Abbildung 38 zeigt den Mittelwert der relativen mRNA Expression von CAR und Cytochrom P450 Monooxygenasen CYP2B6, CYP2A6, CYP3A4, CYP2C8 und CYP1A2 aus drei unabhängigen Knock-down Experimenten mit der shRNA C2 und/oder Behandlungen mit CITCO. CYP2B6, CYP2A6, CYP3A4 und CYP2C8 sind bekannte CAR Targetgene. CYP1A2 hingegen ist kein bekanntes Targetgen und zeigte daher keinen Knock-down. Die shRNA C2 regulierte CAR in drei unabhängigen Hepatozytenchargen im Mittel 49% herunter. CYP2B6 als bekanntes CAR Targetgen wurde um 45% herunterreguliert. Des Weiteren wurde ein Knock-down von CYP2A6 um 60%, CYP3A4 um 43% und CYP2C8 um 42% gefunden. Es wurden noch weitere ADME Gene gemessen, die zumeist keine Effekte gezeigt haben (Daten nicht gezeigt).

Eine Aktivierung von CAR durch die Behandlung der Zellen mit dem spezifischen Agonisten CITCO resultierte in einer deutlichen Induktion der CYP2B6 mRNA von über 10 -fach. CYP2A6 und CYP3A4 zeigten eine Induktion von 4,6-fach bzw. knapp 2-fach. CYP2C8 zeigte eine Induktion von über 3,3-fach. CYP1A2 reagierte überraschenderweise mit einer über 2-fachen Induktion auf die CITCO Behandlung, zeigte aber keine Änderung durch den CAR Knock-down.

Die relative mRNA Expression der von CAR regulierten Gene lag bei einer Kombination des CAR Knock-downs und anschließender Aktivierung von CAR mit CITCO wie erwartet zwischen den Expressionswerten des alleinigen Knock-downs und der alleinigen Behandlung. Auffallend war, dass die Behandlung von CITCO auf die CAR Expression einen negativen Effekt hatte. Somit sank die CAR Expression um 20 % nach CITCO Behandlung ab und in der Kombination aus Knock-down und Behandlung verringerte sich die Expression von CAR sogar um 78%. Dies könnte auf einen auditiven Effekt von Knock-down und der erniedrigten Expression im Falle der Aktivierung zurückzuführen sein.



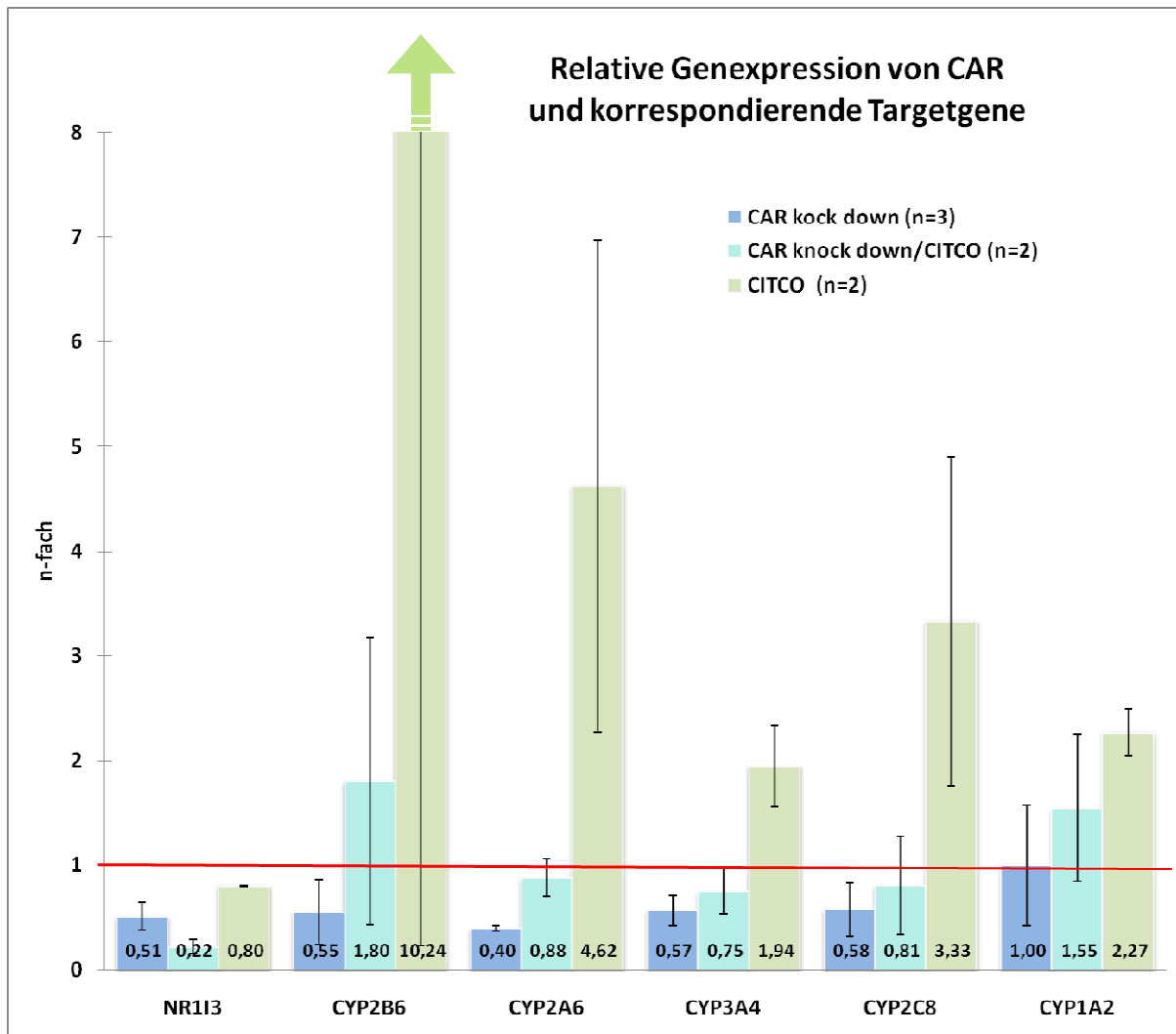


Abbildung 38: Herunterregulierung CAR mit einer spezifischen shRNA (C2), Agonistenbehandlung (CITCO) von CAR bzw. die Kombination (Knock-down + Behandlung) in primären humanen Hepatozyten zum Zeitpunkt 120h nach der Infektion bzw. 24 h nach Behandlung.

4.3.1.2 Proteinexpression in den CAR Knock-down bzw. mit CITCO behandelten Hepatozyten

Um die Effizienz des CAR Knock-downs und der Induktion auf Proteinebene zu zeigen, wurde die Proteinexpression von CYP2B6, welches durch CAR reguliert wird und wie oben gezeigt auf mRNA Ebene die stärksten Effekte zeigte, mittels Westernblot ermittelt und relativ zur DF9 bzw. DMSO Kontrolle quantifiziert. Zudem wurde CYP3A4, ein weiteres, durch CAR schwächer reguliertes Gen und CYP1A2, das nicht durch CAR reguliert wird, quantifiziert. Das ubiquitär exprimierte β -Aktin wurde als interne Ladekontrolle und zur Normierung der Proteinwerte verwendet.

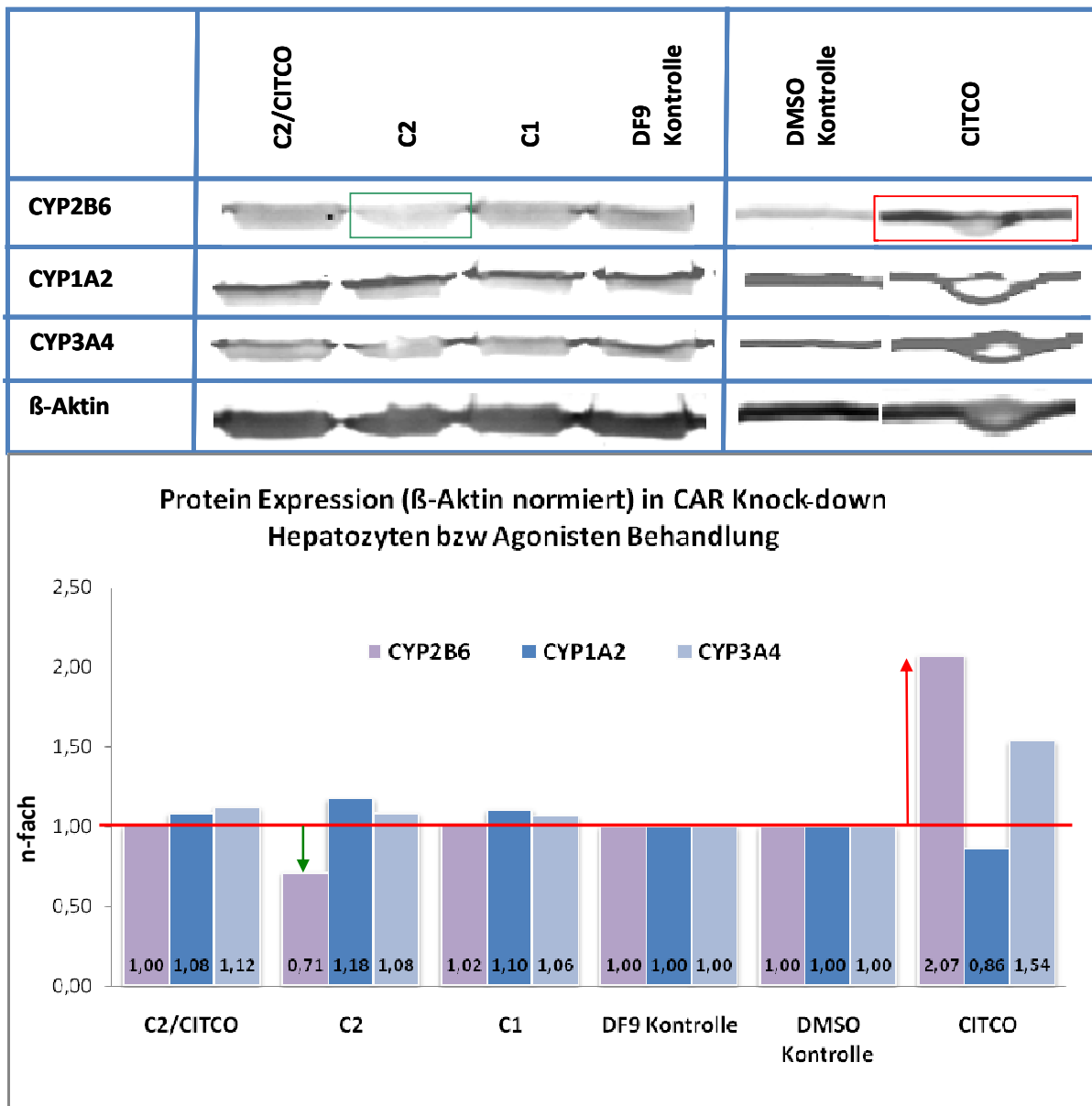


Abbildung 39: Westernblot der Hepatozytenlysate die nach Infektion mit viralen Partikeln C1, C2 und DF9 und/oder 24 stündiger Behandlung mit 1 μ M des spezifischen CAR Agonisten CITCO in primären humanen Hepatozyten. Quantifizierung der Proteine CYP2B6, CYP3A4, CYP1A2 und β -Aktin, wobei β -Aktin zur Normierung verwendet wurde.

Die so erhaltenen relativen Proteinwerte sind in Abbildung 39 zusammengefasst. Ein Knock-down von CAR durch die shRNA C2 resultierte in einem 29%-igem Knock-down des Cytochrom P450 2B6 Proteins, während C1 keinen Knock-down von CYP2B6 zur Folge hatte. Eine Aktivierung von CAR durch CITCO führte zu einer Steigerung der Proteinexpression von CYP2B6 um 100%. Der Knock-down von CAR und die anschließende Aktivierung von CAR durch CITCO hatte auf CYP2B6 Protein keinen Einfluss. Dies könnte durch ein zunächst herunterreguliertes CYP2B6 Protein, welches anschließend durch die Aktivierung von CAR

mit CITCO wieder induziert wurde, erklärt werden. Die Induktion und auch der Knock-down von CAR hatte auf die mRNA Expression von CYP2B6 einen deutlich stärkeren Effekt als auf die Proteinexpression, was aber durch die zeitlich versetzte Bildung von mRNA und Protein in der Zelle erklärbar sein könnte. Ein Knock-down von CAR hatte weder auf die Proteinexpression von CYP1A2 noch auf CYP3A4 einen Einfluss gezeigt, ebenso wie eine Kombination aus Knock-down und Behandlung mit CITCO. Lediglich die Behandlung mit CITCO alleine zeigte eine Induktion von CYP3A4 um 54%. Diese Induktion durch CITCO wurde für CYP3A4 zuvor auch auf mRNA Ebene beobachtet. Für CYP1A2 konnte die zuvor auf mRNA Ebene gezeigte erhöhte Expression nach CITCO Behandlung auf Proteinebene nicht gezeigt werden. Der Knock-down und die Aktivierung von CAR mit der shRNA C2 bzw. mit CITCO zeigten auf mRNA und Proteinebene den erwarteten Effekt, nämlich eine Abnahme bzw. Aktivierung von CAR und der von CAR regulierten Targetgen. Deshalb sollte dieses System zur Analyse der Zusammenhänge zwischen nukleären Rezeptoren, am Beispiel von CAR, und der Expression von microRNAs gut geeignet sein.

4.3.1.3 microRNA Expression in CAR Knock-down bzw. mit CITCO behandelten Hepatozyten

Da auf mRNA Ebene und auf Proteinebene der Knock-down von CAR und/oder einiger Zielgene durch die shRNA C2, sowie eine Induktion der Zielgene durch Behandlung mit dem spezifischen Agonisten CITCO gezeigt werden konnte, wurde in diesen Hepatozyten Chargen die microRNA Expression von 380 microRNAs gemessen. Die Ergebnisse wurden relativ zu der DF9 bzw. DMSO Kontrolle ermittelt. Zur Vermeidung von Fehlern wurden alle microRNAs, die einen Ct-Wert über 30 aufwiesen, nicht in die Analyse mit einbezogen, da diese wegen zu niedriger Expression und zu erwartender erhöhter Streuung die Datenqualität gefährdeten.



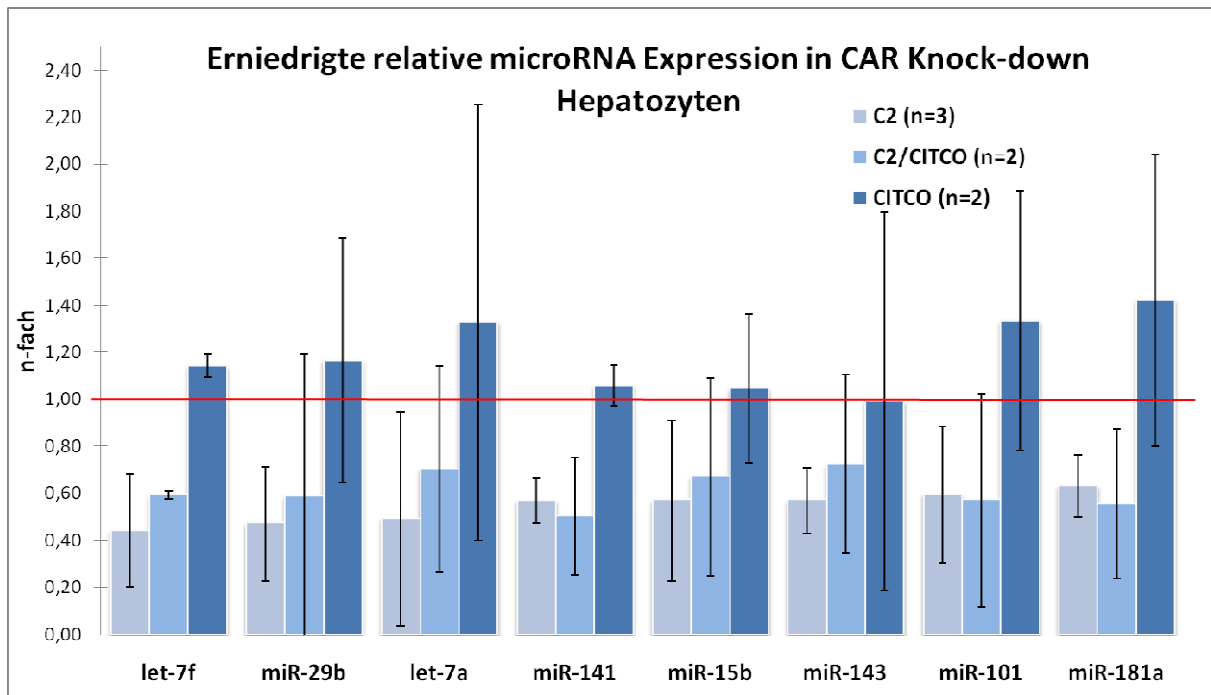


Abbildung 40: MicroRNAs mit erniedrigter Expression nach CAR Knock-down und erhöhter Expression nach CITCO Behandlung in Hepatozyten. Die microRNA Expressionen wurden relativ zur DF9 bzw. DMSO Kontrolle berechnet. Resultierende miRNA Daten wurden auf RNU48 normiert.

In Abbildung 40 sind ausschließlich microRNAs gezeigt, die eine erniedrigte Expression in den CAR Knock-down Hepatozyten und eine Induktion in den CITCO behandelten Hepatozyten aufwiesen. Die microRNAs let-7f, miR-29b, let-7a, miR-101 und miR-181a zeigten im Mittel aus drei unabhängigen Hepatozytenchargen eine erniedrigte Expression von über 40% nach einem CAR Knock-down sowie eine um 14 bis 42% erhöhte Expression in den CITCO behandelten Zellen. MiR-141, miR-15b, und miR-143 zeigten eine deutliche Abnahme der Expression in den Zellen in denen CAR herunterreguliert war, jedoch keinen oder nur einen geringen Anstieg der Expression in CITCO behandelten Hepatozyten.

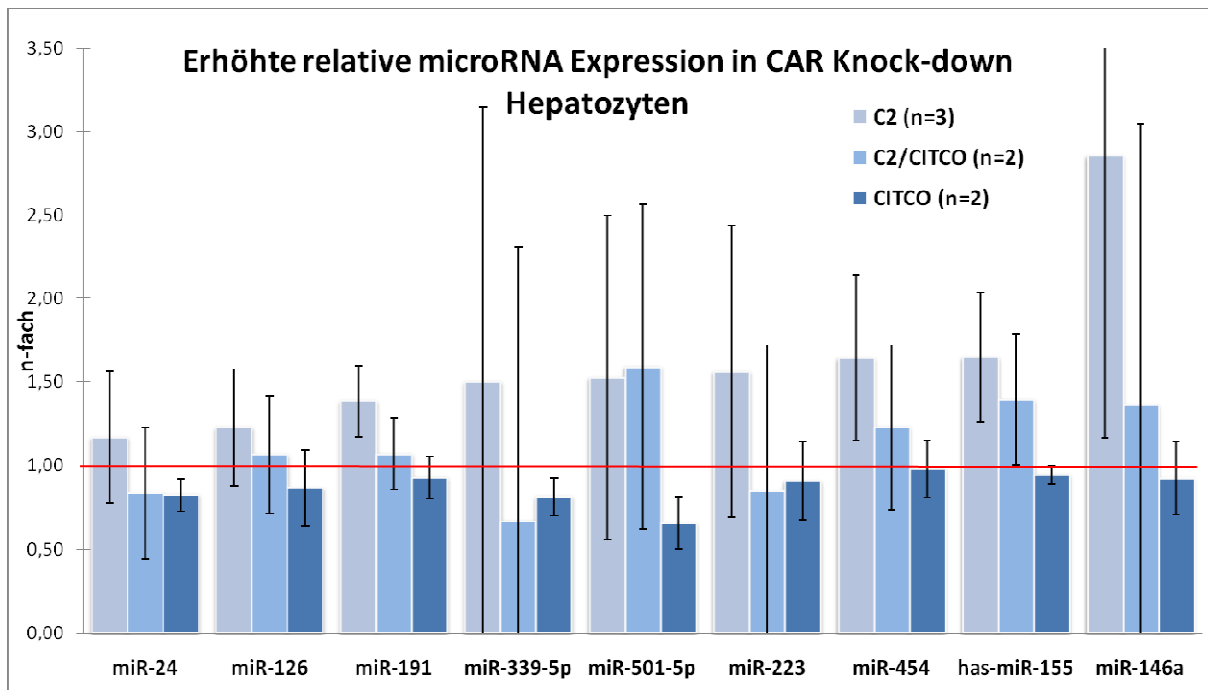


Abbildung 41: MicroRNAs mit erhöhter Expression nach CAR Knock-down und erniedigter Expression nach CITCO Behandlung in Hepatozyten. Die microRNA Expressionen wurden relativ zur DF9 bzw. DMSO Kontrolle berechnet. Resultierende miRNA Daten wurden auf RNU48 normiert.

Einige microRNAs (siehe Abb. 41) zeigten in den CAR Knock-down Hepatozyten eine erhöhte Expression und eine Erniedrigung in den CITCO behandelten Zellen. MiR-146a reagierte nach einem CAR Knock-down mit einer Erhöhung der Expression um über 180% und zeigte damit die stärksten Effekte. Aber auch miR-155, miR-223 und miR-501-5p waren im Mittel über 50% höher exprimiert und zeigten eine verringerte Expression in den CITCO behandelten Zellen.

4.3.1.4 *In silico* Transkriptionsfaktor Analyse

Um heraus zu finden, welche dieser miRNAs möglicherweise einer direkten Regulation durch CAR unterliegen, wurden Promotorsequenzen mit dem frei verfügbaren online Tool MatInspector von Genomatix auf potentielle Bindestellen für CAR überprüft. MiR-143 und miR-101 hatten eine vorhergesagte Bindestelle für CAR (siehe Tab. 24) und könnten möglicherweise direkt durch CAR reguliert sein, während die anderen miRNAs möglicherweise indirekt reguliert sein könnten.

Bioinformatische Analysen mit dem MatInspector zeigten ebenfalls eine CAR Bindestelle im miR-146a Promotor, welche nach CAR Knock-down eine Induktion zeigte. Dies könnte auf eine mögliche repressive Regulation durch CAR hindeuten.

Tabelle 24: Bindestellen Analyse von Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit Hilfe von MatInspector (Genomatix). Vorhergesagte CAR Bindestellen im miRNA Promotor. In Großbuchstaben ist jeweils die Erkennungssequenz hervorgehoben.

miRNA	TF BS	Start- position	End- position	Sequenz	Expr. Kd
miR-143	CAR-RXR	47	71	aaggta GGTC aacatattaataat	↓
miR-101	CAR-RXR	145	169	gattga GGTC agggaggcacagtca	↓
miR-146a	CAR-RXR	403	427	aagcct GGTA aatccaatgcagctg	↑

4.4 MicroRNA Quantifizierung in humanem Lebergewebe

4.4.1 Quantifizierung der microRNAs im Hochdurchsatzverfahren.

Die am IKP-Stuttgart bestehende Lebergewebebank (siehe 3.5) wurde zur Untersuchung und Quantifizierung von in Leber relevanten microRNAs verwendet. Dafür war es notwendig die Gesamt-RNA aus dem gefrorenen Lebergewebe zu isolieren, da in den bestehenden RNA eine Quantifizierung von kleinen RNAs nicht quantitativ möglich war. Es wurde dafür aus 150 Lebergeweben die Gesamt-RNA isoliert und anschließend die Qualität der Isolierung mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 überprüft, um eine gute Qualität der Proben zu sichern. Die RNA wurde revers transkribiert und präamplifiziert, um dann die Quantifizierung durch quantitative real time PCR auf einem Fluidigm Chip durchzuführen. Diese Technologie von Biomark ermöglicht es, 96 bzw. 48 Proben mit 96 bzw. 48 Assays gleichzeitig zu messen.

Es wurden 64 wichtige microRNA Assays ausgewählt mit denen zunächst 92 Proben der Leberbank gemessen und analysiert wurden. Die Analysen der 92 Proben umfassten Korrelationen mit nicht-genetischen Faktoren wie z.B. Geschlecht, Rauchverhalten oder Krankheitsbild sowie Korrelationen mit für die Leberbank vorhandenen mRNA und Proteindaten. Zur Validierung der gefundenen Effekte und zur Erhöhung der Probenanzahl wurden in einem weiteren Set von 48 Proben 16 microRNAs, die interessante Effekte in den vorangegangenen Analysen zeigten, in Dreifachbestimmung quantifiziert.

4.4.2 Korrelationen der nicht genetischen Faktoren mit microRNA Expressionen

Wie oben erwähnt, wurden die microRNA Expressionsdaten statistisch mit den für die Leberbank dokumentierten, nicht-genetischen Faktoren, wie Rauchen, Alter, Geschlecht, Krankheiten, Medikation und Laborparameter korreliert. Keine der 64 quantifizierten microRNAs zeigte eine signifikante Korrelation mit Rauchen, Alkohol oder dem Geschlecht. Die stärksten Assoziationen waren für Cholestase zu beobachten (Tab. 25). Die Klassifizierung der Leberbankproben in cholestatiches und nicht-cholestatiches Material wurde durch Anne Nies (IKP, Stuttgart) nach den Kriterien von (Bénichou, 1990) durchgeführt (Nies et al., 2009).



Tabelle 25: Korrelationen der microRNA Expression in den humanen Leberproben (n=92) mit Cholestase (Kontrollen n= 76; Cholestase n=16)

Cholestase			
microRNA	n-fache Änderung in Cholestase vs Kontrolle	unadjustierter p-Wert	Benjamini Hochberg Korrektur p-Wert
miR-21	2,54	**** (0,0000003)	***
miR-130b	2,51	**** (0,000022)	**
miR-34a	2,41	**** (0,000035)	**
miR-132	2,20	*** (0,0001)	**
miR-17	0,64	**	n.s.
miR-19b	0,74	**	n.s.
miR-221	1,59	**	n.s.
miR-130a	1,27	**	n.s.
miR-455-3p	0,69	**	n.s.
miR-19a	0,80	**	n.s.
miR-200c	2,54	*	n.s.
miR-142-3p	1,45	*	n.s.
miR-122	0,81	*	n.s.
miR-27b	0,69	*	n.s.
miR-31	1,92	*	n.s.
miR-148a	0,69	*	n.s.
miR-455-5p	0,70	*	n.s.
miR-27a	1,41	*	n.s.

Tabelle 25 listet microRNAs auf, die eine signifikant (p-Wert kleiner 0,05) erhöhte oder erniedrigte Expression in cholestatistischen Leberproben aufwiesen. Zehn der 64 gemessenen microRNAs zeigten eine signifikant erhöhte Expression in Cholestase. Nach Korrektur für multiples Testen (Benjamini Hochberg), waren vier microRNAs (miR-21, miR-34a miR-132 und miR-130b) mit einem p-Wert < 0,0001 immer noch hoch signifikant mit Cholestase assoziiert. Die Expression war für diese miRNAs rund 2-3-fach höher. Zudem zeigten acht microRNA eine erniedrigte Expression in Cholestase, darunter unter anderem miR-148a, miR-27b und die leberspezifische miR-122 . Für die hier am stärksten korrelierten microRNAs wurden die Daten in einem Scatterplot grafisch dargestellt (Abb. 42).

Für miR-21 (A) ergab sich eine um 2,54-fache Erhöhung der Expression in cholestatischen Lebern, für die miR-34a (B) 2,51-fach, die miR-132 (C) 2,2-fach und für die miR-130b (D) 2,51-fach. Dabei war die miR-21 am stärksten mit Cholestase assoziiert. Die miR-21, miR-34a miR-132 und miR-130b waren auch mit Laborparametern, die in Cholestase Patienten meist erhöht sind wie, der gamma Glutamyl-Transferase Wert (Tab. 26), signifikant korreliert.

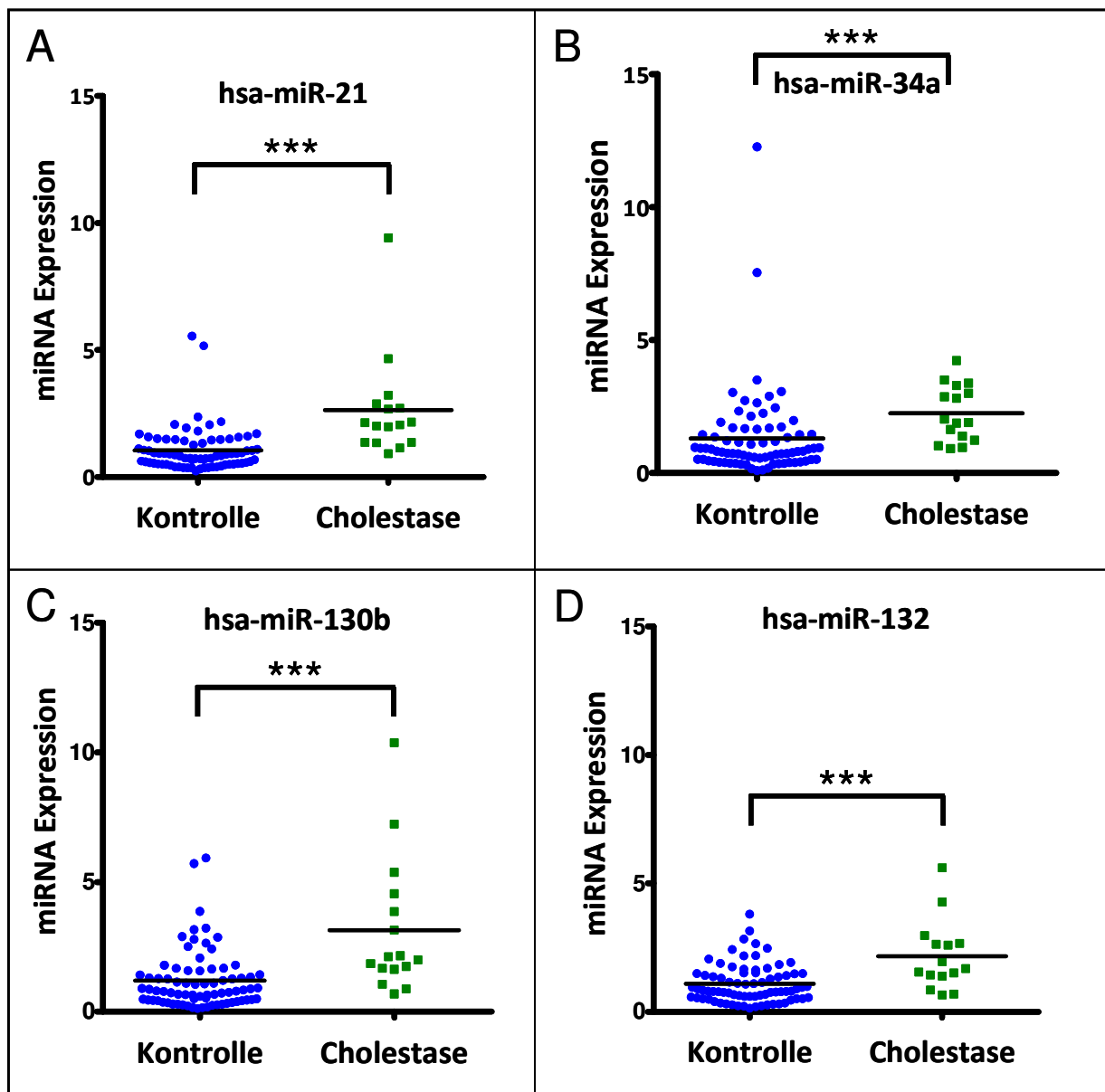


Abbildung 42: Scatterblot der microRNAs, die bei cholestatischen Patienten eine signifikant erhöhte Expression aufwiesen (Kontrollen n=76; Cholestase n=16). (A) hsa-miR-21 (B) hsa-miR-34a (C) hsa-miR-130b (D) hsa-miR-132.

Tabelle 26: Korrelationen der microRNA Expression in den humanen Leberproben mit Gamma-Glutamyl-Transferase Aktivitäten.

Gamma-Glutamyl-Transferase			
microRNA	n-fach erhöhter GGT vs normal	unadj. p-Wert	BH-adj. p-Wert
miR-21	2,00	****	**
miR-34a	2,27	****	**
miR-221	1,38	***	*
miR-142-3p	1,70	**	n.s.
miR-130b	1,90	**	n.s.
miR-132	1,84	**	n.s.
miR-130a	1,39	**	n.s.
miR-150	1,51	*	n.s.
miR-19b	0,79	*	n.s.
miR-106b	1,20	*	n.s.
miR-19a	0,83	*	n.s.

Tabelle 27: Korrelationen der microRNA Expression in den humanen Leberproben mit den CRP (C-reaktives Protein) Werten

C-reaktives Protein			
microRNA	n-fach erhöhtes CRP vs normal	unadj. p-Wert	BH-adj. p-Wert
miR-130b	6,00	***	**
miR-21	3,13	***	*
miR-34a	3,10	*	n.s.
miR-130a	2,10	*	n.s.
miR-18b	1,98	*	n.s.
miR-142-3p	1,62	*	n.s.
miR-539	2,53	*	n.s.
miR-200c	5,83	*	n.s.

Auffällig war auch, dass miR-130b, miR-21 und miR-34a in den Proben mit erhöhten Werten für das C-reaktive Protein (CRP), ein Marker für Entzündungen, stark erhöht waren (Tab. 27). MiR-130b war 6-fach, miR-21 und miR-34a über 3-fach induziert. Entzündungen der Leber sind oft ursächlich an der Entstehung von Cholestase beteiligt, so könnte dieser Zusammenhang möglicherweise erklärbar sein.

4.4.3 Korrelationsanalysen der microRNA Expressionen mit SIRT1

Um einen Zusammenhang zwischen Cholestase und den erhöhten Expressionen von miR-21, miR-34a, miR-132 und miR-130b zu erklären, wurden Literaturrecherchen durchgeführt. Dabei wurde nach validierten Zielgenen für diese miRNAs gesucht, die mit Cholestase oder der Entstehung von Cholestase assoziiert waren. Es fiel auf, dass miR-34a und miR-132 ein gemeinsames Zielgen, SIRT1 haben (Abb. 43). SIRT1 ist eine NADP⁺-abhängige Deacetylase, die eine Schlüsselaufgabe im Lipid- und Glukosestoffwechsel einnimmt, indem sie metabolische Regulatoren deacetyliert und damit aktivieren oder deaktivieren kann. Der nukleäre Rezeptor FXR ist einer dieser Regulatoren der durch SIRT1 reguliert wird (Lee and Kemper, 2010); Colak et al., 2011). FXR ist ein wichtiger Regulator der Gallensäure Biosynthese und des Gallensäure Transportes. Dieser Zusammenhang könnte eine mögliche Erklärung für die Assoziation dieser miRNAs mit Cholestase sein. Die Expressionsanalysen der mRNA von SIRT1 und den gemessenen microRNA Expressionen ergab, wie in Tabelle 28 und in Abbildung 44 gezeigt, eine negative Korrelation mit acht der 64 gemessenen miRNAs, wobei sieben davon signifikant waren und drei einen Spearman Koeffizienten $< -0,3$ aufwiesen. Wie erwartet korrelierten die microRNAs miR-132 und miR-34a negativ mit der SIRT1 mRNA, was SIRT1 als Zielgen für diese microRNAs, wie in der Literatur beschrieben, bestätigt. Zudem war eine starke negative Korrelation von SIRT1 und der ebenfalls bei Cholestase erhöhten miR-21 mit einem Spearman Koeffizienten von $-0,41$ zu beobachten. Dieser Effekt wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.



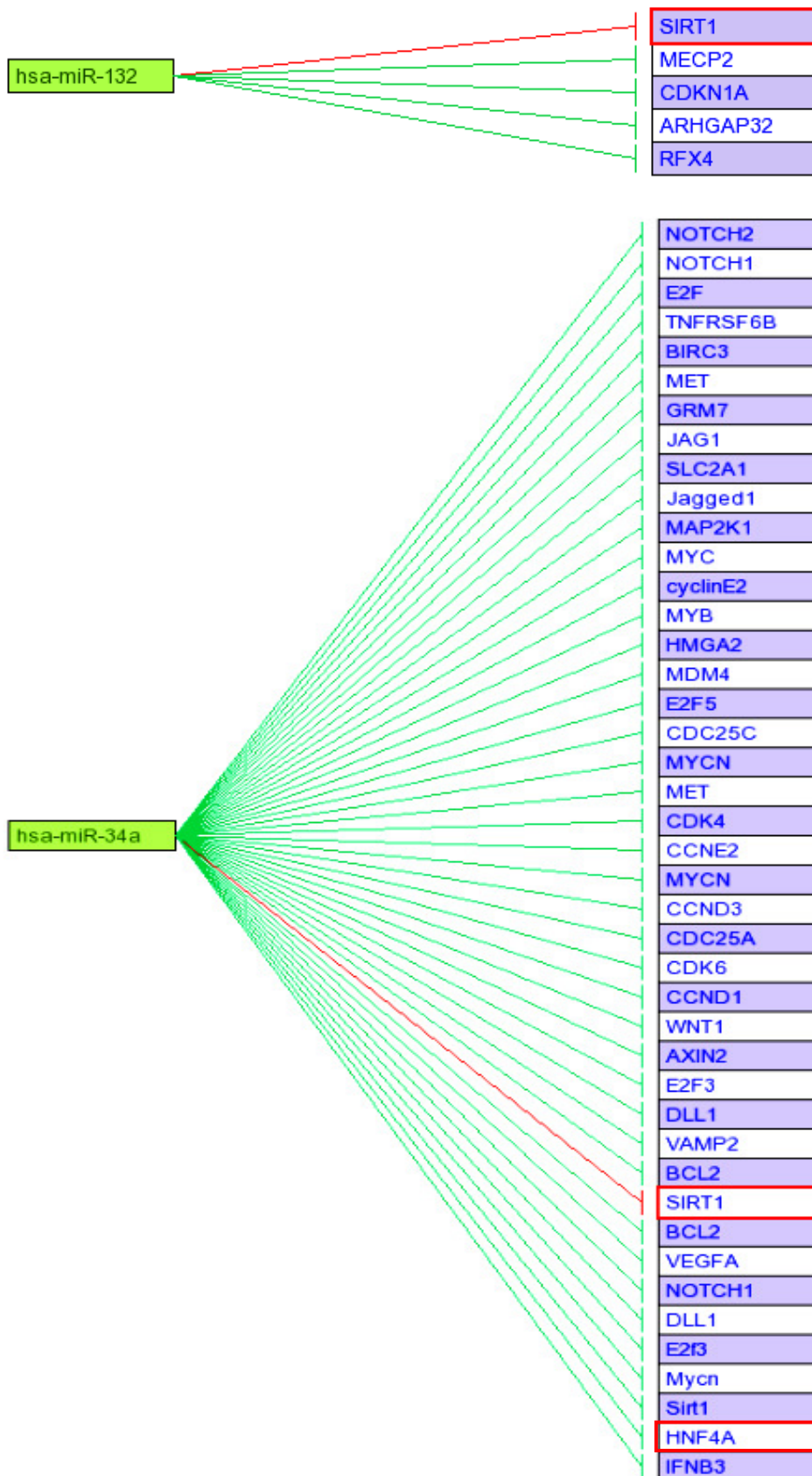


Abbildung 43: Validierte Zielgene für miR-132 und miR-34a, ermittelt mit miRTarBase(Hsu et al., 2010). In Rot hervorgehoben sind Targetgene der miR-132 und miR-34a, die in dieser Arbeit analysiert wurden.

Tabelle 28: Korrelation von SIRT1 mRNA und microRNAs

	miR-130b	miR-185	miR-150	miR-106b	miR-146a	miR-132	miR-21	miR-34a
Anzahl der Paare	92	92	92	92	92	92	92	92
Spearman r_s	-0,20	-0,25	-0,27	-0,29	-0,29	-0,32	-0,41	-0,48
p -Wert (zweiseitig)	0,0574	0,0151	0,0083	0,0053	0,0052	0,0019	< 0,0001	< 0,0001
p- Wert	ns	*	**	**	**	**	****	****
Signifikant?	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

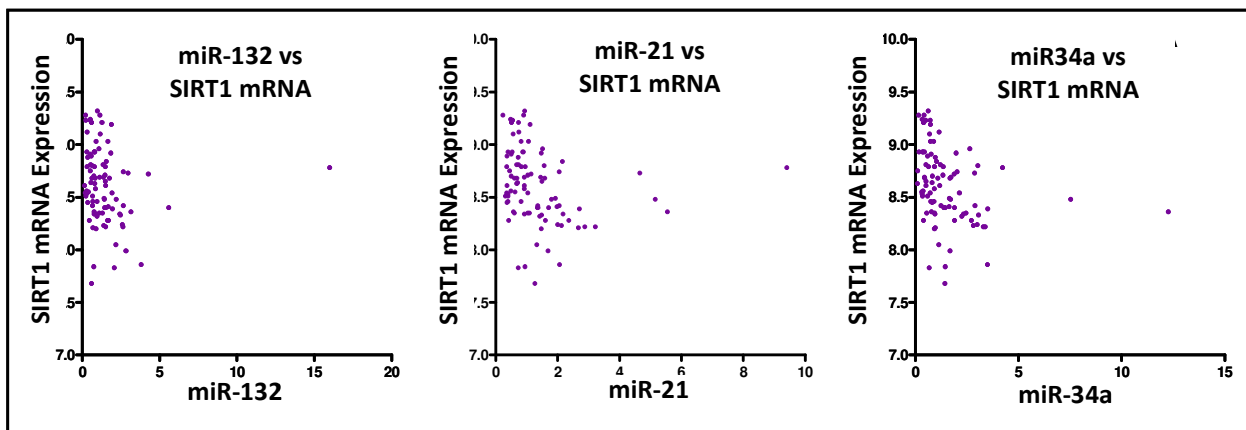


Abbildung 44: Korrelationen von SIRT1 mRNA mit miR-132, miR-21 oder miR-34a. Die Spearman r_s und p-Werte sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Wurden darüber hinaus die microRNAs miR-132, miR-21 und miR-34a mit den mRNA Werten von FXR, einem Targetgen von SIRT1 korreliert, zeigte sich ein ähnliches Bild wie für SIRT1. Die Werte korrelierten mit höchster Signifikanz negativ mit FXR (Tab. 29). Dies könnte zum Einen auf eine direkte Regulation dieser microRNAs oder aber auf eine indirekte z.B. über SIRT1 hindeuten. Weitere Analysen dazu könnten Aufschluss über den zugrunde liegenden Mechanismus geben.

Tabelle 29: Korrelation der microRNAs miR-132, miR-21 und miR-34a mit der FXR mRNA

Parameter	miR-132	miR-21	miR-34a
Nummer der XY Paare	92	92	92
Spearman r_s	-0,37	-0,45	-0,40
P Wert (zweiseitig)	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
P Wert Zusammenfassung	***	****	****

4.4.4 HNF4a als validiertes Zielgen für miR-34a

Ein weiteres Zielgen der miR-34a, welches einen möglichen Zusammenhang mit Cholestase haben könnte ist HNF4a (Abb. 43). Die Regulation von HNF4a durch die miR-34a wurde *in vitro* von (Takagi et al., 2010) gezeigt und validiert. Um diese Regulation in humanem Lebergewebe zu untersuchen wurde von 70 Lebern die HNF4a Protein Expression mittels Westernblot detektiert. Von diesen 70 Proben waren zehn cholestatisch. Für diese 70 Proben existierten zudem quantitative mRNA und miRNA Daten.

Abbildung 45 zeigt die Korrelation der HNF4a mRNA Expression mit der Protein Expression in 70 Lebern. Wie in der Literatur beschrieben wurde keine Korrelation der HNF4a mRNA und der Protein Expression beobachtet. Auch wurde keine Korrelation der HNF4a mRNA mit der miR-34a Expression dieser Proben gefunden (Abb. 46A). Korrelationsanalysen des HNF4a Proteins und der miR-34a Expression zeigte allerdings eine signifikant negative Korrelation (Abb. 46B) mit einem Spearman r_s von -0,37 und einem P-Wert von 0,0019, was die post-transkriptionelle Regulation von HNF4a durch miR-34a erstmalig an *ex vivo* Gewebeproben bestätigt.

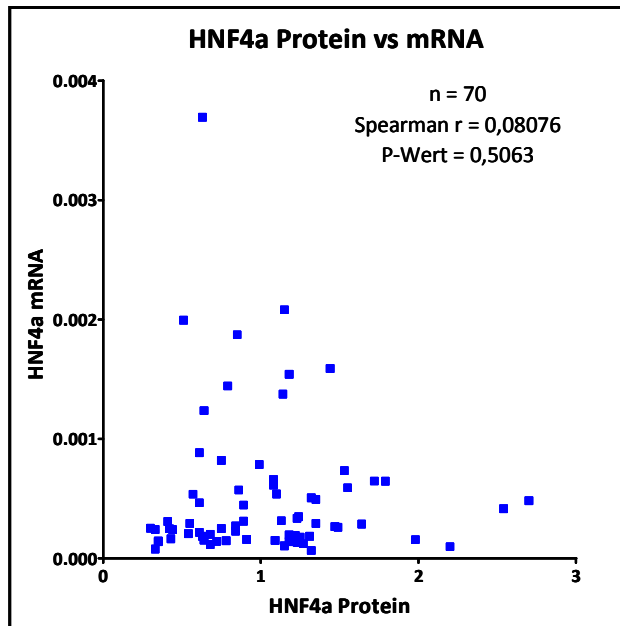


Abbildung 45: Korrelation der HNF4a mRNA (RPLP0 normiert) mit der HNF4a Protein Expression (β -Aktin normiert) von 70 Leberproben.

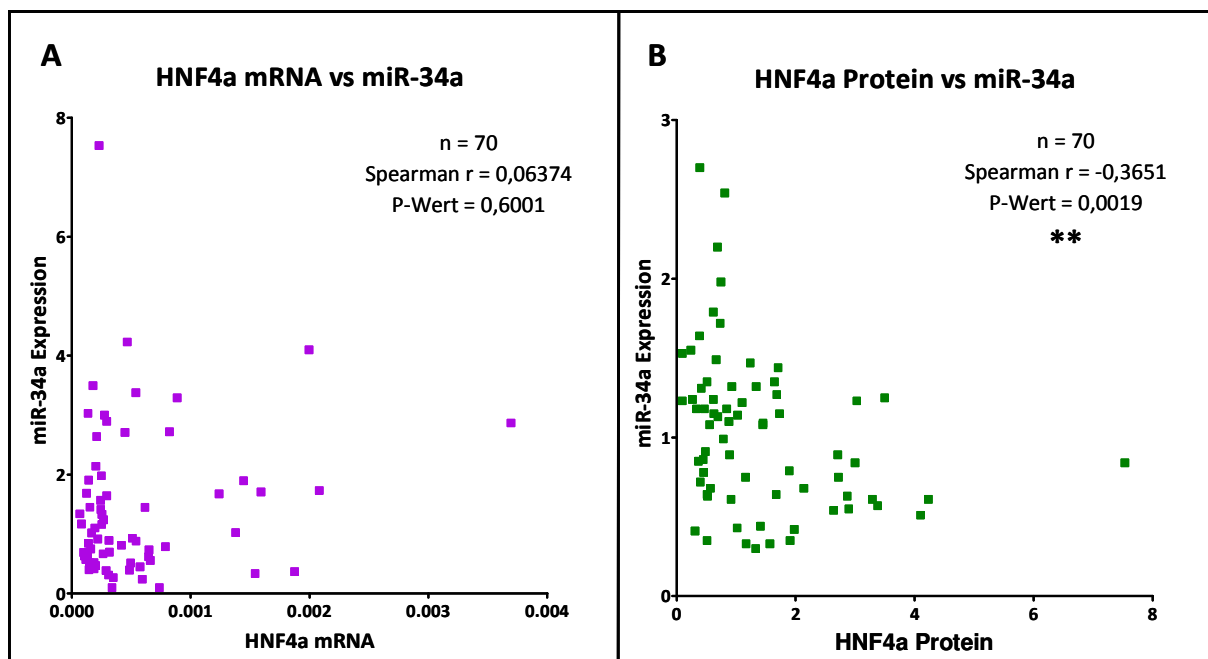


Abbildung 46: Korrelationen der miR-34a Expression (RNU48 normiert) mit der HNF4a (A)mRNA (RPLP0 normiert) bzw. (B) Protein Expression (β -Aktin normiert).

4.4.5 HNF4a und Cholestase

Da HNF4a durch miR-34a negativ reguliert wird und die miR-34a in cholestatischen Proben, wie unter 4.4.2 gezeigt, um 2,4-fach erhöht war, müsste HNF4a in Cholestase eine erniedrigte Protein Expression aufweisen. In Abbildung 47 ist die HNF4a Expressionen von gesunden (n=60) und cholestatischen (n=10) Lebern der Leberbank für mRNA und Protein im Vergleich dargestellt. Die HNF4a mRNA Expression war in cholestatischen Lebern signifikant (2,4-fach) erhöht, wohingegen die HNF4a Protein Expression in den cholestatischen Lebern um 24% niedriger war als in den Kontrollen (nicht-cholestatische Leber). Diese Diskrepanz der mRNA und Protein Expression könnte durch die erhöhte miR-34a Expression in Cholestase erklärt werden, da die miR-34a wie oben gezeigt eine 2,4-fach höhere Expression in cholestatischen Proben aufwies.

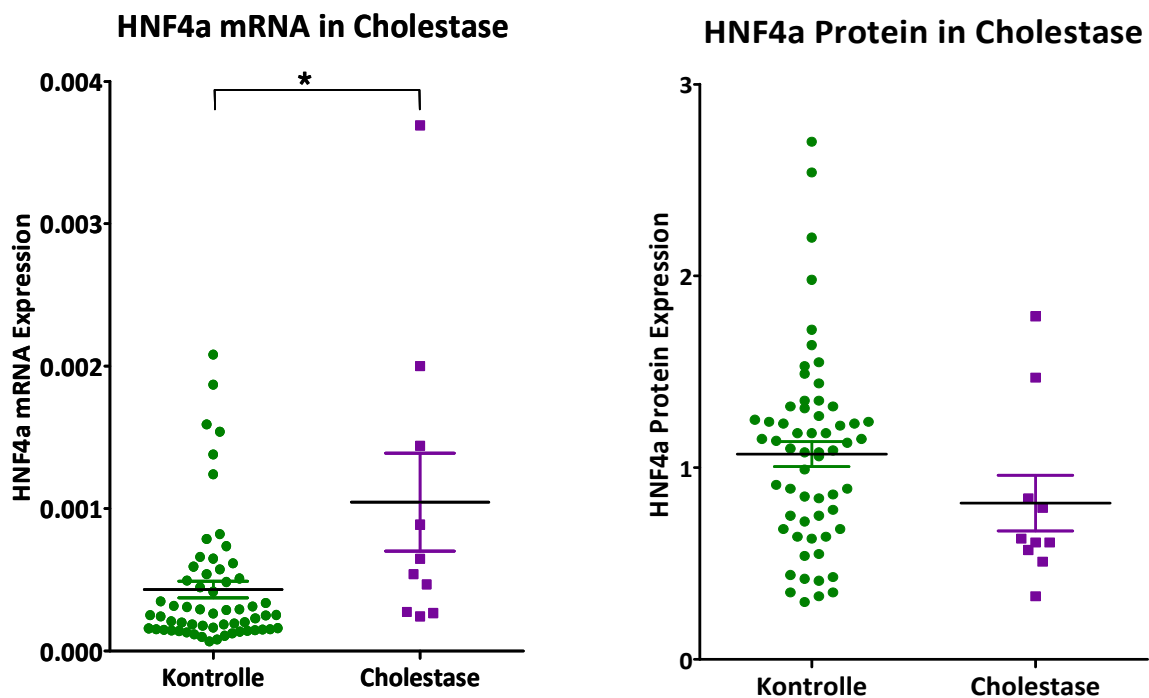


Abbildung 47: Vergleich der HNF4a mRNA Expression in gesunden (n=60) mit cholestatischen Lebern (n=10) und der HNF4a Protein Expression in gesunden (n=60) mit cholestatischen Lebern (n=10).

5 DISKUSSION

5.1 Vorhersagedatenbanken für microRNA Bindestellen

Bindestellen von microRNAs an 3'UTRs von Zielgenen können durch die Entwicklung von Algorithmen berechnet und vorhergesagt werden. Zur Entwicklung eines Algorithmus werden beispielsweise konservierte Bereiche der Bindungsstelle, die Art der „Seed“-Sequenzen (7mere oder 8mere), die daraus resultierende Bindungsenergie oder die Anzahl an Bindungsstellen verwendet. Es sind verschiedene Datenbanken zur Vorhersage möglicher Bindestellen verfügbar, die jedoch eigene Algorithmen verwenden und daher zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. Auch ist die Anzahl an falsch positiven oder falsch negativen Ergebnissen ein Problem bei der Vorhersage von Bindestellen (Sethupathy et al., 2006).

Kombinationen der Ergebnisse mehrerer Datenbanken und Bildung einer Schnittmenge der Vorhersagen für ein Gen können die Qualität der Vorhersagen verbessern. Datenbanken wie miRò (Laganà et al., 2009) oder miRecord (Xiao et al., 2009) bieten eine Abfrage von mehreren Datenbanken an. Jedoch sind diese Abfragen nur für jedes Gen einzeln möglich. Abfragen für mehrere Gene werden unübersichtlich und lassen sich auch nicht in einer Datei vereinen. Auch bieten diese Datenbanken keine Funktionen an mit denen die ermittelten Daten zusätzlich analysiert werden können. Eine anwenderspezifische, auf Laborexperimente basierende Filteroperation ist nicht vorhanden und Speicherungen der Ausgaben im Programm sind nicht möglich.

Aufgrund dieser Limitationen wurde das Programm MIRNA-DISTILLER entwickelt, das speziell auf die Bedürfnisse von Anwender eingeht. Die gängigen Abfragen von mehreren Datenbanken für mehrere Gene werden vom Programm automatisiert durchgeführt und übersichtlich dargestellt (siehe 4.1). Das Programm ermöglicht es erstmals interaktiv mit den Vorhersagedaten zu arbeiten. Selbst ermittelte microRNA Expressionsdaten können in das Programm importieren werden, um spezifische Filter zu generieren. Durch die frei konfigurierbare Filteroption effektive Werkzeuge gegeben um den Datensatz der Wahl in einen wissenschaftlich relevanten Kontext zu stellen. Durch diese Optionen vereinfacht

MIRNA-DISTILLER die Arbeit mit Vorhersage-Datenbanken und hilft die durch das Programm ermittelten Daten jederzeit mit experimentellen Daten abzugleichen (Rieger et al., 2011).

Durch die Anwendung des Programms konnten verschiedene in der Leber relevante miRNAs herausgefiltert werden. Der Anteil der in Leber relevanter miRNAs reduzierte sich um 75%. Zudem war eine Priorisierung der miRNAs, die einen Einfluss insbesondere auf ADME Gene haben, möglich. Ein durch den MIRNA-DISTILLER ermittelter Kandidat mit vielen Bindestellen in den ausgewählten/vorgegebenen ADME Genen war miR-143. Deshalb wurde miR-143 für die Hepatozytenexperimente ausgewählt (4.2.5).

Auch konnten validierte miRNA Bindestellen z.B. für die miR-122 mit dem MIRNA-DISTILLER wiedergefunden werden (4.1.3). Da sich die Verwendung von mehreren Datenbanken als Standardmethode durchgesetzt hat und von den meisten mit miRNA arbeitenden Wissenschaftlern praktiziert wird, kann MIRNA-DISTILLER eine große Hilfe sein.

5.2 Hepatozyten als Zellsystem zur Untersuchung der microRNA Regulation von ADME Genen

Cytochrom P450 Enzyme sind in den gängigen Zelllinien nur schwer oder gar nicht detektierbar, wohingegen Hepatozyten eine gut messbare Expression auf mRNA-, Protein- und Aktivitätsebenen aufweisen (Gómez-Lechón et al., 2004). Primäre humane Hepatozyten zeichnen sich durch ihre leberähnlichen Eigenschaften und ihre intakte Regulationsmaschinerie aus. Das qualifiziert sie zur Verwendung für Untersuchungen von ADME Gen Regulationen durch microRNAs. Aber auch zur Untersuchung der microRNA Regulation durch Transkriptionsfaktoren sind sie gut geeignet

Jedoch weisen primäre humane Hepatozyten andere Limitationen auf, was die Versuchsplanung und Gestaltung, im Gegensatz zu Zelllinien, erschwert. Da es sich bei Hepatozyten um frisch isolierte Lebergewebszellen handelt, die von Operationen stammen, stehen sie nicht jederzeit zur Verfügung. Des Weiteren ist der Zustand der Zellen je nach Spender oder Aufarbeitung extrem variabel und kann nicht vorhergesehen werden (Goyak et al., 2008; Rogue et al., 2012). Diese Spendervariabilität kommt zudem durch Vorerkrankungen, Lebensstil und genetischen Hintergrund des jeweiligen Donors zustande.



Dies kann die Reproduzierbarkeit von Experimenten beeinflussen und ist im Vergleich zu Zelllinien komplexer. Ein weiteres Problem stellt die zeitlich limitierte Kultivierbarkeit der Zellen dar. Hepatozyten beginnen schon nach wenigen Tagen in Kultur zu dedifferenzieren und verlieren ihre gewebespezifischen Eigenschaften, was die Verwendbarkeit für bestimmte Fragestellungen einschränkt. Auch das Einbringen von Vektoren durch Transfektion ist im Gegensatz zu Zelllinien erschwert (Feidt et al., 2009).

5.2.1 Lentivirale Transduktion von primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten lassen sich im Gegensatz zu den meisten Zelllinien nur schwer transfizieren. Für Überexpressions- und insbesondere für Knock-down Experimente ist eine gute Transfektionseffizienz jedoch essentiell. Um ein effektives Einbringen von DNA in humanen Hepatozyten zu garantieren, wurden in dieser Arbeit Lentiviren verwendet. Lentiviren eignen sich insbesondere auch für Zellen, die sich nicht teilen. Ihre DNA integriert ins Genom, was eine stabile Expression über eine längere Zeit ermöglicht (Naldini et al., 1996). Die Integration ins Genom war für die hier durchgeführten Experimente, zur Gewährleistung einer konstanten Expression über den kompletten Zeitraum (5 Tage), von Vorteil.

In der Literatur wurde durch (Zamule et al., 2008) gezeigt, dass Lentiviren weder einen Einfluss auf die mRNA Expression von Albumin, noch von den wichtigsten nukleären Rezeptoren wie CAR, RXR α , PXR und HNF4 α in humanen Hepatozyten haben. Deshalb waren sie für die Untersuchung der miRNA Regulation durch nukleäre Rezeptoren und miRNA Regulation der ADME Gene gut geeignet. Um jedoch unbekannte Nebeneffekte der Lentiviren zu minimieren wurden in jedem Experiment Kontrollviren mitgeführt, die eine Infektion der Zellen hervorrufen, jedoch keine aktive Sequenz beinhalten.



Durch lentiviral eingebrachte miRNAs bzw. shRNAs besteht die Gefahr der Beeinträchtigung der endogenen miRNA Biosynthese durch Überladung des Systems (Pan et al., 2011). Deshalb wurde eine MOI von drei gewählt, die eine effektive Infektion der Zellen erlaubt, aber die Prozessierungsmaschinerie der endogenen microRNAs nicht komplett blockiert. So sollten Nebeneffekte, die aufgrund der eingebrachten Sequenzen hervorgerufen werden, minimiert werden. Durch die Verwendung einer niedrigen MOI können, durch eine geringere miRNA bzw. shRNA Konzentration in den Zellen, weniger starke Zielgeneffekte die Folge sein.

5.3 Überexpression und Knock-down von microRNAs in primären humanen Hepatozyten

Regulationen durch spezielle microRNAs wurden durch Überexpression oder Knock-down und anschließender Detektion der mRNA- und Proteinexpression und der Aktivität von ausgewählten ADME Genen untersucht. Durch die Etablierung eines Verfahrens, welches die Messung von mRNA, Protein und Aktivität aus einem Well ermöglichte, konnte die intra-Assay-Variabilität minimiert werden. Die mRNA Expression der ADME Gene wurden mit TaqMan® Array Micro Fluid Cards quantifiziert, womit diese Gene parallel und unter denselben Bedingungen analysiert werden konnten. Pipettierfehler wurden durch diese Maßnahme weitestgehend ausgeschlossen. Trotz dieser standardisierten Bedingungen war es schwierig Effekte über die verschiedenen Ebenen (mRNA, Protein, Aktivität) zu reproduzieren. Die Variabilität der Ergebnisse zwischen den einzelnen Hepatozytenchargen war hingegen geringer als erwartet.

In dieser Arbeit wurden dafür miR-143, miR-27b und miR-148a verwendet. Auffällig war, dass nach einem microRNA Knock-down oder einer Überexpression die gemessenen Effekte auf die Gene verhältnismäßig schwach waren. Selbst bekannte Zielgene zeigten nur geringfügige Änderungen, was zum Einen an einer nicht kompletten Infektion der Hepatozyten zurückzuführen sein könnte. Dies würde eine stöchiometrische Verfälschung der tatsächlichen Effekte zur Folge haben.

Andererseits wurde in der Literatur beschrieben (Bartel, 2004)), dass microRNAs Stellgrößen zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der Genexpression in der Zelle sind und demzufolge, extreme Auslenkungen durch andere microRNAs abgepuffert werden können. Mehrere microRNAs können kombinatorisch auf ein Zielgen wirken um regulatorische



Effekte zu verstärken oder abzuschwächen (Ivanovska and Cleary, 2008). Das würde bedeuten, dass Veränderungen einer miRNA durch Hoch- oder Herunterregulierung möglicherweise durch andere, endogene miRNAs in der Zelle abgefangen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass bei guter Überexpression der microRNA im Fall von miR-143 (4.2.2) konsistentere Ergebnisse für die Zielgene im Vergleich zu weniger stark überexprimierter miRNAs (miR-148a und miR-27b) erzielt werden konnte.

Die korrespondierende Proteinexpression zeigte allerdings zum selben Zeitpunkt kaum Änderungen, was auf einen verzögerten Effekt auf Proteinebene zurückzuführen sein könnte oder an Regulationsmechanismen durch andere endogene microRNAs. Dabei wäre denkbar, dass durch die Überladung der microRNA Prozessierungsmaschinerie andere miRNAs, die auf dieselben Gene regulatorisch wirken, in nicht mehr ausreichender Menge exprimiert werden und dadurch die Protein Expression beeinflussen könnten. Folglich würden dann aber die Aktivitäten der CYPs mit den Proteinwerten korrelieren, was nicht der Fall war. Die Aktivitäten korrelierten jedoch stärker mit der mRNA Expression. Diese Tatsache könnte ein Hinweis auf die Limitationen der Proteinmessmethode hindeuten. Quantitative Proteinexpressionsmessung mittels Westernblot im Vergleich zu mRNA- oder Aktivitätsmessung ist die weniger sensitive Methode und leichte Veränderungen der Expression können nur selten eindeutig quantifiziert werden. Des Weiteren wäre auch denkbar, dass die Diskrepanz zwischen den Aktivitäten der CYPs und den dazugehörigen Proteinwerten an der Struktur der Cytochrome liegen könnte. CYPs nehmen eine Sonderstellung ein. Sie sind nur aktiv wenn sie als Holoprotein vorliegen, d.h. wenn sie ein Häm gebunden haben (Yu et al., 2009). Im Westernblot jedoch wird auch unaktives Apoprotein detektiert und könnte somit die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Um bei geringen Änderungen verlässliche Aussagen treffen zu können müssten deutlich mehr Hepatozytenchargen analysiert werden.



5.3.1 Effekte der miR-143 auf CAR, CYP2C8 und CYP2B6

Die Effekte der miR-143 (4.2.2) waren auf mRNA Ebene am deutlichsten zu sehen. CAR, CYP2B6 und CYP2C8 zeigten in den verschiedenen Hepatozytenchargen starke und konsistente Ergebnisse. Ein miR-143 Knock-down resultierte in einer über 50% erhöhten Expression von CAR, CYP2B6 und CYP2C8, während eine miR-143 Überexpression zu einer 20%igen Erniedrigung dieser Gene führte, was auf eine direkte oder indirekte Regulation durch miR-143 schließen lässt. Da CYP2C8 und CYP2B6 durch CAR reguliert werden (Ferguson et al., 2005 Raver-Shapira et al., 2007), könnte eine Regulation dieser Gene auch indirekt durch CAR über miR-143 möglich sein. Die DNA-Methyltransferase 3A, ein validiertes Zielgen für miR-143 (Ng et al., 2009), reagierte nach einer miR-143 Überexpression bzw. einem Knock-down mit einer um rund 20% veränderten mRNA Expression und zeigte demnach eine schwächere Reaktion.

Um zu überprüfen, ob in den besagten Genen eine vorhergesagte Bindestelle für miR-143 existiert, wurden Datenbankanalysen mit dem MIRNA-DISTILLER durchgeführt. Jedoch wurde für keines der drei Gene eine Bindestelle vorhergesagt. Lediglich für CYP2C8 wurde eine Bindestelle für die miR-143*, also dem Gegenstrang der miR-143 gefunden. Jedoch konnten durch Reporterger Assays keine direkte Regulation für CYP2C8 gefunden werden.

Ein weiterer Faktor könnte möglicherweise HNF4a sein. HNF4a besitzt eine vorhergesagte Bindestelle für miR-143 und reguliert die Expression von CAR (Pascussi et al., 2007). HNF4a zeigte nach einer miR-143 Überexpression in Hepatozyten eine um 15% erniedrigte Expression und nach einem miR-143 Knock-down eine um 19% erhöhte Expression. Dies könnte ein Hinweis auf eine indirekte Regulation der miR-143 über HNF4a sein.



5.4 miR-27b und CYP3A4

Da Pan et al., 2009 gezeigt hatten, dass miR-27b CYP3A4 reguliert, wurde die miR-27b für Hepatozytenexperimente als Kontrolle ausgewählt. Jedoch konnte der beschriebene Effekt weder auf mRNA, Protein noch auf Aktivitätsebene gezeigt werden, obwohl miR-27b nach Überexpression 21-fach erhöht war und auch ein Zielgen (ST14) der miR-27b eine deutliche Abnahme zeigte.

Korrelationsanalysen der miR-27b und CYP3A4 Proteinwerte in der Leberbank (nicht gezeigt) zeigten ebenfalls keine negative Korrelation. Diese Beobachtungen könnten darauf hindeuten, dass möglicherweise die Regulation von CYP3A4 *in vivo* eine untergeordnete Relevanz hat. Pan et al., 2009 zeigte eine Regulation von CYP3A4 durch miR-27b in Pankreas und Darm Zelllinien. Zudem wurden Reportergen Analysen durchgeführt. Dafür verwendeten sie die 3'UTR der CYP3A4 Transkriptvariante 1, die als die anerkannte Variante gilt. Diese Transkriptvariante besitzt eine 1153 bp lange 3'UTR und eine MRE für die miR-27b. Jedoch existieren noch zwei weitere Transkriptvarianten. Die Variante 2 besitzt eine verkürzte 3'UTR, die 411 bp lang ist und keine MRE für miR-27b aufweist. Diese Variante wird aber analog zur Variante 1 translatiert. Li et al., 2011a untersuchten die Quantität der Varianten in Hepatozyten und Leber und fanden heraus, dass ungefähr 60% der CYP3A4 mRNA mit der kürzeren 3'UTR exprimiert wird, stabiler als die Variante 1 ist und mehr Protein produziert. Dies könnte erklären, warum sowohl in den Hepatozyten als auch in der Leberbank kein nennenswerter regulatorischer Effekt der miR-27b auf CYP3A4 gefunden werden konnte. Da Pan et al., 2009. als Zellsystem Darm und Pankreaszellen verwendeten und deutliche Effekte gefunden hatten, könnte möglicherweise in diesen Zellen die Transkriptverteilung eine andere sein und demzufolge einen stärkeren regulatorischen Einfluss haben.

Denkbar wäre auch, dass die Transkriptvariante 1 durch die miR-27b gebunden in sogenannten P-Bodys der Zelle vorliegt und so durch eine Herunterregulierung der miR-27b eine schnelle Induktion von CYP3A4 möglich wäre. Dies könnte auch erklären warum ein Knock-down von miR-27b in den Hepatozyten einen 22%igen Anstieg des CYP3A4 Proteins zur Folge hatte (siehe 4.2.4) aber keinen Effekt auf die mRNA zeigte.



5.5 Regulation der microRNAs durch nukleäre Rezeptoren

Bisher wurden in der Literatur zumeist die regulatorischen Eigenschaften der microRNAs untersucht, während die Regulation der microRNA Expression noch recht unerforscht ist. Einige Arbeiten zu diesem Thema zeigen jedoch, dass miRNAs durch nukleäre Rezeptoren reguliert werden. Nukleäre Rezeptoren sind Transkriptionsfaktoren die durch endogene als auch exogene Liganden aktiviert werden können. Eine Ligandenbindung führt zu einer Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren und/oder zu einer Promotorbindung, was zu einer Aktivierung von Genen bzw. microRNAs führt (Yang and Wang, 2011). Ein paar Beispiele in der Literatur zeigen, dass die Regulation von microRNAs in der Leber durch nukleäre Rezeptoren eine Rolle spielt.

Li et al., 2011b identifizierten beispielsweise HNF4a als Schlüsselregulator der leberspezifischen miR-122. Ein weiteres Beispiel ist die Regulation von miR-613 durch SREBP-1c, das durch LXRA reguliert wird (Ou et al., 2011). Diese und noch weitere Publikationen lassen annehmen, dass weitere miRNAs durch nukleäre Rezeptoren reguliert werden.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt, um mögliche Regulationen der microRNA Expression durch nukleären Rezeptoren zu untersuchen. Als Zellsystem dienten primäre humane Hepatozyten aufgrund der oben (4.2) genannten Gründe. Die Hepatozytenexperimente wurden wie unter 4.4. beschrieben durchgeführt. Zur Untersuchung der möglichen Regulationen, wurden zum einen CAR mit shRNAs herunterreguliert und zum anderen die Hepatozyten mit CITCO, einem spezifischen CAR Agonisten behandelt. Anschließend wurde in den Zellen die Expression von 380 miRNA quantifiziert.

Durch den Knock-down von CAR wiesen einige der gemessenen microRNAs ebenfalls eine erniedrigte Expression auf. Es gab allerdings auch miRNAs die eine deutlich erhöhte Expression zeigten.

Eine Herunterregulierung nach einem CAR Knock-down und eine Hochregulierung nach einer CITCO Behandlung zeigten fünf der gemessenen microRNAs (let-7f, miR-29b, let-7a, miR-101 und miR-181a). Diese microRNAs könnten somit direkt von CAR reguliert werden, da sie

durch einen spezifischen Agonisten indizierbar sind und ein Knock-down von CAR einen über 40%-igen Knock-down der microRNAs hervorruft. Drei der gemessenen microRNAs zeigten eine deutlich niedrigere Expression in den CAR Knock-down Zellen wohingegen eine CITCO Behandlung keine eindeutige Induktion zeigte (miR-143, miR-141, miR-15b). Diese microRNA könnten möglicherweise durch die basale Expression von CAR reguliert werden. Es reagierten allerdings auch einige miRNAs mit einer Induktion nach einem CAR Knock-down und mit einer verminderten Expression nach einer CITCO Behandlung. Dies deutet auf eine negative Regulation dieser miRNAs durch CAR hin. Herausragende Effekte zeigte vor allem die miR-146a. Neben miR-146a, waren auch miR-155 und miR-223 durch einen CAR Knock-down induziert. Auffällig war, dass diese drei miRNAs mit Entzündung assoziiert sind (Rusca and Monticelli, 2011). Diese miRNAs werden durch NFkB positiv reguliert. Zhou et al., 2006 zeigten erstmals in Mäusen, dass NFkB durch PXR reguliert wird. PXR Knock-out Mäuse zeigten erhöhte Expression pro-inflammatorischer Gene, die durch NFkB reguliert werden. Da PXR und CAR zumeist einen ähnliches Targetgenspektrum aufweisen, könnte es nahe liegen, dass ein Knock-down von CAR einen Anstieg von NFkB und demzufolge auch der miRNAs die durch NFkB reguliert werden zur Folge hat.



5.6 MicroRNAs in Cholestase

MicroRNAs weisen in verschiedensten Krankheiten eine veränderte Expression auf und haben unter anderem auch eine große Bedeutung bei der Entstehung von Krankheiten (Nicolas and Lopez-Martinez, 2010). Es ist daher nahe liegend, dass es auch in Cholestase zu einer Deregulation der microRNAs kommt. Diese Hypothese wurde durch die Messungen der Expressionen von 64 verschiedenen microRNAs in 92 Leberproben bestätigt. Dabei wurde gezeigt, dass in cholestatischen Lebern mehrere microRNAs, im Vergleich zu nicht cholestatischen Lebern, hoch signifikant erhöht waren. Dieser Effekt war selbst nach multiplem Testen noch hoch signifikant. Die miR-21, miR-34a, miR-130b und miR-132 zeigten dabei die robustesten Ergebnisse und waren in den cholestatischen Lebern ca. 3-fach höher exprimiert.

Validierte Zielgene dieser microRNAs wurden mit Hilfe der Datenbank miRTarBase (Hsu et al., 2010), die bereits publizierte Zielgene einer beliebigen microRNA ausgibt, ausgewählt. Für miR-130b jedoch sind dort keine Zielgene verfügbar. Für die miR-21, miR-34a und miR-132 wurden Zielgene gefunden, die unter anderem auch einen Einfluss auf die Cholestase haben könnten. Sirtulin1 ergab sich dabei als gemeinsames Zielgen für miR-132 und miR-34a. Sirtulin1 ist eine Deacetylase, die durch Deacetylierung von Proteinen, diese aktivieren oder deaktivieren kann (Kong et al., 2009). Diese Eigenschaft macht sie zu einem wichtigen Regulator von verschiedensten Prozessen in der Zelle. Lee and Kemper, 2010 zeigen, dass die Regulation von SIRT1 durch die miR-34a eine wichtige Rolle bei metabolischen Krankheiten spielt und dabei vor allem einen indirekten Effekt auf FXR hat und als FXR/miR-34a/SIRT1 regulatory loop bezeichnet wird. Da FXR aber vor allem auch an der Regulation der Gallensäureproduktion beteiligt ist, wäre hiermit ein möglicher Zusammenhang von miR-34a, aber möglicherweise auch miR-132 (Strum et al., 2009) und Cholestase gefunden.

In den Leberproben wurden hoch signifikante negative Korrelationen der miR-21, miR-132 und miR-34a mit FXR und SIRT1 gefunden, was den beschriebenen Zusammenhang zwischen dieser miRNAs mit FXR bzw. SIRT1 erstmals in Lebergewebe bestätigt. Da in Cholestase die Expression der microRNAs erhöht ist, könnten sie dort durch die mögliche Herunterregulierung von SIRT1 zu vermehrtem acetyliertem FXR und so zu dessen Inaktivierung führen. Dies könnte zu einer gestörten Regulation des Gallensäure-Transports



und Produktion führen, was möglicherweise eine Akkumulation von toxischen Gallensäuren hervorrufen und demzufolge zur Cholestase führen könnte.

5.6.1 HNF4a als Zielgen der miR-34a in Cholestase

Ein weiteres Zielgen der miR-34a ist HNF4a (Takagi et al., 2010), ein wichtiger, in Leber hoch exprimierter nukleärer Rezeptor. HNF4a reguliert in der Leber verschiedenste Gene, die unter anderem für die Synthese und den Metabolismus von Cholesterol, Fettsäuren und Gallensäuren kodieren (Gonzalez, 2008). Da HNF4a im Zusammenhang mit der Regulation der Gallensäure Biosynthese steht und durch miR-34a reguliert wird, könnte eine veränderte miR-34a Expression ein Faktor in der Entwicklung einer Cholestase sein.

Zur Überprüfung der durch (Takagi et al., 2010) gezeigten direkten Regulation von HNF4a durch miR-34a, wurden zunächst die für die Leberbank existierenden mRNA Werte für HNF4a mit den miR-34a Expressionen korreliert (siehe 4.4.4). Es ergab sich keine Korrelation, ebenso wie es keine Korrelation zwischen der mRNA und der Protein Expression von HNF4a zu finden war. Korrelationsanalysen der HNF4a Protein Expression und der miR-34a Expression zeigten jedoch eine signifikant negative Korrelation. So konnten die von (Takagi et al., 2010) in HepG2 gefundenen Ergebnisse erstmalig in humanem Lebergewebe gezeigt werden.

Darüber hinaus war die HNF4a mRNA in cholestatischen Proben 2,4-fach erhöht, während die Protein Expression eine um 24% erniedrigte Expression aufwies. Diese Diskrepanz entspricht in etwa der unter 4.4.2 gezeigten 2,41-fachen erhöhten miR-34a Expression. Deshalb stellt sich die Frage, ob eine erhöhte HNF4a mRNA zu der Erhöhung der miR-34a Expression führt, um diese Auslenkung des Systems zu kompensieren.

Eine weitere interessante Beobachtung war die in Cholestase erniedrigte miR-122 Expression. Es konnte von Li et al., 2011b gezeigt werden, dass miR-122 durch HNF4a positiv reguliert wird. Da HNF4a Protein im Gegensatz zur mRNA in cholestatischen Lebern herunterreguliert ist, ist die logische Konsequenz, dass miR-122 ebenfalls erniedrigt sein müsste, was auch der Fall war. Da HNF4a für die Funktion der Leber wichtig ist, könnte jede



Veränderung zu einer problematischen Stoffwechsellage und damit zu verschiedensten Krankheiten führen.

MiR-34a ist eine der meist untersuchten microRNAs. Neben der oben beschriebenen Regulation von HNF4a spielt sie in verschiedensten Mechanismen eine Rolle. So wurde von (Raver-Shapira et al., 2007) gezeigt, dass miR-34a durch p53 reguliert wird und eine bedeutende Rolle im Zellzyklus und Apoptose einnimmt. Eine Anhäufung an toxischen Gallensäuren könnte demnach zu einer Induktion von p53 und somit zu einer erhöhten miR-34a Expression führen was letztendlich zur Apoptose der Zelle führen könnte.

5.7 MicroRNAs als Biomarker

Die unter 4.4 mit Cholestase assoziierten microRNAs könnten sich möglicherweise als Biomarker für eine Cholestase eignen. Eine Quantifizierung dieser microRNAs müsste dann aber in Leberbiopsien durchgeführt werden, was durch den invasiven Eingriff jedoch mit Risiken verbunden wäre und sich demzufolge als Standardmethode nicht eignen würde. MicroRNAs können auch im Serum quantifiziert werden. Mittlerweile wurden einige Arbeiten veröffentlicht, die Hinweise darauf geben, dass sich microRNAs als potenzielle Biomarker für verschiedenste Krankheiten eignen (Ciesla et al., 2011).

Zu den in dieser Arbeit gefundenen, in Cholestase veränderten microRNAs sind in der Literatur mögliche Anwendungen für diagnostische Zwecke beschrieben worden. Cermelli et al., 2011 zeigten z.B., dass miR-34a und miR-122 potentielle Biomarker für den Fibrosegrad in Patienten mit chronischer Hepatitis C (CHC) Infektion oder nicht alkoholischer Fettleber (NAFLD) sein könnten, da die Serum-Level dieser miRNAs mit dem histologischen Krankheitsgrad dieser Patienten korrelierten. Xu et al., 2011 hingegen konnte miR-21 als einen möglichen Biomarker für eine Leberschädigung identifizieren. Heneghan et al., 2011 wiederum fand eine Korrelation von miR-132 im Blut von Übergewichtigen Patienten und miR-130b wurde als möglicher Biomarker für schwere Schwangerschaftstoxikosen identifiziert (Wu et al., 2011).

Demzufolge wäre eine Quantifizierung dieser microRNAs in Blutproben von einer gut dokumentierten Cholestase Kohorte sinnvoll, um eine Eignung dieser microRNAs als potentielle Biomarker für die Diagnose von Cholestase zu überprüfen.



5.8 Schlussfolgerung

Die Regulation durch miRNAs im Allgemeinen, aber auch in der Arzneimittelforschung durch die Beteiligung an der Regulation von arzneimittelmetabolisierenden Genen gewinnt immer mehr an Aufmerksamkeit. Aber auch in der Erforschung von Krankheiten und deren Entwicklung nimmt die microRNA Regulation immer mehr an Bedeutung zu. Das Interesse an der microRNA Forschung ist in den letzten zehn Jahren enorm gestiegen was sich auch an der Anzahl der Veröffentlichungen bemerkbar macht. Jedoch sind Testsysteme zur Untersuchung von microRNA Regulationen speziell für arzneimittelmetabolisierende Gene limitiert. Herkömmliche Zellkultursysteme der Leber, wie die Zelllinie HepG2 oder Huh7 können nur bedingt zum Einsatz kommen, da diese nahezu keine Expression der wichtigsten Cytochrom P450 Enzyme aufweisen aber auch die microRNA Expression sich stark unterscheidet. Demzufolge sollte ein Testsystem etabliert werden welches möglichst leberähnlich ist und microRNA Regulationen zuverlässig und reproduzierbar untersucht werden können.

Als Zellsystem eigneten sich demnach primäre humane Hepatozyten. Zur Untersuchung einzelner miRNAs wurden die Hepatozyten, lentiviral mit miRNA Expressions- und Knock-down Vektoren transduziert. Dadurch wurden die transduzierten miRNAs gezielt überexprimiert oder durch die Knock-down Vektoren herunterreguliert, was mittels quantitativer PCR überprüft werden konnte. Des Weiteren wurde die Expression von 45 ADME Genen auf mRNA Ebene ermittelt, von neun ADME Genen die Protein Expression detektiert und von sieben Cytochrom P450 Enzymen die Aktivität bestimmt. Zur Überprüfung der Ergebnisse in einem artifiziellen System wurden Reporterger Assays für CYP2C8 und CYP3A4 durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es im Hochdurchsatzverfahren miRNA Regulationen *ex vivo* zu überprüfen und gegebenenfalls *in vitro* Beobachtungen zu validieren.

Zur Untersuchung der Regulation von microRNA selbst eignet sich das in Hepatozyten etablierte System. So können z.B. nukleäre Rezeptoren herunterreguliert oder induziert werden, um mögliche Expressionsänderungen von miRNAs zu beobachten, was Aufschluss über eine transkriptionelle Regulation von microRNAs geben kann. Experimente dieser Art

leisten einen Beitrag zum Verständnis der allgemeinen miRNA Regulationsmechanismen, aber können auch Aufschluss zur Entstehung von Krankheiten geben oder helfen neue Therapieansätze zu finden.

Ein weitere Möglichkeit zu Untersuchung von microRNA Regulationen sind Assoziationsstudien. Korrelationen der miRNA Expression mit genetischen oder nicht genetischen Faktoren können Aufschluss über mögliche Zusammenhänge geben. In dieser Arbeit konnte so ein Zusammenhang einer veränderten Expression von miR-130b, miR-132, miR-21 und miR-34a und Cholestase gefunden werden. Diese Beobachtung ermöglicht es, weitere Untersuchungen diesbezüglich durchzuführen, um gegebenenfalls neue Biomarker für eine cholestatische Erkrankung der Leber zu finden. Auch können weitere Analyse dieser microRNAs im Bezug auf die Entwicklung von Cholestase therapeutische Ansätze schaffen.



6 LITERATUR

- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bénichou, C. (1990). Criteria of drug-induced liver disorders. Report of an international consensus meeting. *J. Hepatol.* 11, 272–276.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell* 28, 328–336.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185–191.
- Borchert, G.M., Lanier, W., and Davidson, B.L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol* 13, 1097–1101.
- Byrne, J.A., Strautnieks, S.S., Mieli-Vergani, G., Higgins, C.F., Linton, K.J., and Thompson, R.J. (2002). The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123, 1649–1658.
- Cermelli, S., Ruggieri, A., Marrero, J.A., Ioannou, G.N., and Beretta, L. (2011). Circulating MicroRNAs in Patients with Chronic Hepatitis C and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS One* 6,.
- Ciesła, M., Skrzypek, K., Kozakowska, M., Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2011). MicroRNAs as biomarkers of disease onset. *Anal Bioanal Chem* 401, 2051–2061.
- Colak, Y., Ozturk, O., Senates, E., Tuncer, I., Yorulmaz, E., Adali, G., Doganay, L., and Enc, F.Y. (2011). SIRT1 as a potential therapeutic target for treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Med. Sci. Monit* 17, HY5–9.
- Elton, T.S., Khan, M., and Terentyev, D. (2011). MicroRNAs in cardiovascular disease. *F1000 Med Rep* 3, 10.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379.
- Feidt, D.M., Klein, K., Hofmann, U., Riedmaier, S., Knobloch, D., Thasler, W.E., Weiss, T.S., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2010). Profiling induction of cytochrome p450 enzyme activity by statins using a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail assay in human hepatocytes. *Drug Metab. Dispos* 38, 1589–1597.

- Feidt, D.M., Klein, K., Nüssler, A., and Zanger, U.M. (2009). RNA-interference approach to study functions of NADPH α : cytochrome P450 oxidoreductase in human hepatocytes. *Chem. Biodivers.* *6*, 2084–2091.
- Ferguson, S.S., Chen, Y., LeCluyse, E.L., Negishi, M., and Goldstein, J.A. (2005). Human CYP2C8 is transcriptionally regulated by the nuclear receptors constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, glucocorticoid receptor, and hepatic nuclear factor 4 α . *Mol. Pharmacol.* *68*, 747–757.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* *2008*, 102–114.
- Forman, J.J., and Collier, H.A. (2010). The code within the code: microRNAs target coding regions. *Cell Cycle* *9*, 1533–1541.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* *19*, 92–105.
- Giguère, V. (1999). Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr. Rev.* *20*, 689–725.
- Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V., and Jover, R. (2004). Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr. Drug Metab.* *5*, 443–462.
- Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.-M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., and Guo, A.-Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum. Mutat.* *33*, 254–263.
- Gonzalez, F.J. (2008). Regulation of Hepatocyte Nuclear Factor 4 α -mediated Transcription. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* *23*, 2–7.
- Goyak, K.M.O., Johnson, M.C., Strom, S.C., and Omiecinski, C.J. (2008). Expression profiling of interindividual variability following xenobiotic exposures in primary human hepatocyte cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *231*, 216–224.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* *34*, D140–144.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S., and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* *36*, D154–158.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol. Cell* *27*, 91–105.
- Heneghan, H.M., Miller, N., McAnena, O.J., O’Brien, T., and Kerin, M.J. (2011). Differential miRNA expression in omental adipose tissue and in the circulation of obese patients identifies novel metabolic biomarkers. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *96*, E846–850.

- Hiard, S., Charlier, C., Coppieters, W., Georges, M., and Baurain, D. (2010). Patrocles: a database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates. *Nucleic Acids Res.* *38*, D640–651.
- Hsu, S.-D., Lin, F.-M., Wu, W.-Y., Liang, C., Huang, W.-C., Chan, W.-L., Tsai, W.-T., Chen, G.-Z., Lee, C.-J., Chiu, C.-M., et al. (2010). miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.*
- Ivanovska, I., and Cleary, M.A. (2008). Combinatorial microRNAs: working together to make a difference. *Cell Cycle* *7*, 3137–3142.
- Jennewein, C., von Knethen, A., Schmid, T., and Brüne, B. (2010). MicroRNA-27b contributes to lipopolysaccharide-mediated peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mRNA destabilization. *J. Biol. Chem* *285*, 11846–11853.
- Karbiener, M., Fischer, C., Nowitsch, S., Opriessnig, P., Papak, C., Ailhaud, G., Dani, C., Amri, E.-Z., and Scheideler, M. (2009). microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun* *390*, 247–251.
- Keller, A., Leidinger, P., Bauer, A., ElSharawy, A., Haas, J., Backes, C., Wendschlag, A., Giese, N., Tjaden, C., Ott, K., et al. (2011). Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat Meth* *8*, 841–843.
- Kong, X.-X., Wang, R., Liu, X.-J., Zhu, L.-L., Shao, D., Chang, Y.-S., and Fang, F.-D. (2009). Function of SIRT1 in physiology. *Biochemistry Mosc.* *74*, 703–708.
- Laganà, A., Forte, S., Giudice, A., Arena, M.R., Puglisi, P.L., Giugno, R., Pulvirenti, A., Shasha, D., and Ferro, A. (2009). miRò: a miRNA knowledge base. *Database (Oxford)* *2009*,.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.
- Lang, T., Klein, K., Fischer, J., Nüssler, A.K., Neuhaus, P., Hofmann, U., Eichelbaum, M., Schwab, M., and Zanger, U.M. (2001). Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* *11*, 399–415.
- Lee, J., and Kemper, J.K. (2010). Controlling SIRT1 expression by microRNAs in health and metabolic disease. *Aging (Albany NY)* *2*, 527–534.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843–854.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15–20.
- Li, D., Gaedigk, R., Hart, S.N., Leeder, J.S., and Zhong, X.-B. (2011a). The Role of CYP3A4 mRNA Transcript with Shortened 3'-UTR in Hepatocyte Differentiation, Liver Development, and Response to Drug Induction. *Molecular Pharmacology*.
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* *28*, 91–106.

- Li, Z.-Y., Xi, Y., Zhu, W.-N., Zeng, C., Zhang, Z.-Q., Guo, Z.-C., Hao, D.-L., Liu, G., Feng, L., Chen, H.-Z., et al. (2011b). Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4 α . *J. Hepatol.* *55*, 602–611.
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., and Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* *433*, 769–773.
- Lundstrom, K. (2011). Micro-RNA in disease and gene therapy. *Curr Drug Discov Technol* *8*, 76–86.
- Maglich, J.M., Parks, D.J., Moore, L.B., Collins, J.L., Goodwin, B., Billin, A.N., Stoltz, C.A., Kliewer, S.A., Lambert, M.H., Willson, T.M., et al. (2003). Identification of a novel human constitutive androstane receptor (CAR) agonist and its use in the identification of CAR target genes. *J. Biol. Chem.* *278*, 17277–17283.
- Mangelsdorf, D.J., and Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* *83*, 841–850.
- McDermott, A.M., Heneghan, H.M., Miller, N., and Kerin, M.J. (2011). The therapeutic potential of microRNAs: disease modulators and drug targets. *Pharm. Res.* *28*, 3016–3029.
- Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* *431*, 343–349.
- Miranda, R.C., Pietrzykowski, A.Z., Tang, Y., Sathyan, P., Mayfield, D., Keshavarzian, A., Sampson, W., and Hereld, D. (2010). MicroRNAs: master regulators of ethanol abuse and toxicity? *Alcohol. Clin. Exp. Res.* *34*, 575–587.
- Mishra, P.J., Humeniuk, R., Mishra, P.J., Longo-Sorbello, G.S.A., Banerjee, D., and Bertino, J.R. (2007). A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 13513–13518.
- Mohri, T., Nakajima, M., Fukami, T., Takamiya, M., Aoki, Y., and Yokoi, T. (2010). Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem. Pharmacol* *79*, 1045–1052.
- Nakajima, M., and Yokoi, T. (2011). MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy: regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol. Ther.* *131*, 330–337.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* *272*, 263–267.
- Ng, E.K.O., Tsang, W.P., Ng, S.S.M., Jin, H.C., Yu, J., Li, J.J., Röcken, C., Ebert, M.P.A., Kwok, T.T., and Sung, J.J.Y. (2009). MicroRNA-143 targets DNA methyltransferases 3A in colorectal cancer. *Br. J. Cancer* *101*, 699–706.
- Nicolas, F.E., and Lopez-Martinez, A.F. (2010). MicroRNAs in human diseases. *Recent Pat DNA Gene Seq* *4*, 142–154.

Nies, A.T., Koepsell, H., Winter, S., Burk, O., Klein, K., Kerb, R., Zanger, U.M., Keppler, D., Schwab, M., and Schaeffeler, E. (2009). Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50, 1227–1240.

Noam Shomron (2010). MicroRNAs and pharmacogenomics.

Ono, K. (2011). MicroRNA links obesity and impaired glucose metabolism. *Cell Res.* 21, 864–866.

Ou, Z., Wada, T., Gramignoli, R., Li, S., Strom, S.C., Huang, M., and Xie, W. (2011). MicroRNA hsa-miR-613 targets the human LXR α gene and mediates a feedback loop of LXR α autoregulation. *Mol. Endocrinol* 25, 584–596.

Pan, Q., de Ruiter, P.E., von Eije, K.J., Smits, R., Kwekkeboom, J., Tilanus, H.W., Berkhout, B., Janssen, H.L.A., and van der Laan, L.J.W. (2011). Disturbance of the microRNA pathway by commonly used lentiviral shRNA libraries limits the application for screening host factors involved in hepatitis C virus infection. *FEBS Lett* 585, 1025–1030.

Pan, Y.-Z., Gao, W., and Yu, A.-M. (2009). MicroRNAs regulate CYP3A4 expression via direct and indirect targeting. *Drug Metab. Dispos* 37, 2112–2117.

Parks, D.J., Blanchard, S.G., Bledsoe, R.K., Chandra, G., Consler, T.G., Kliewer, S.A., Stimmel, J.B., Willson, T.M., Zavacki, A.M., Moore, D.D., et al. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science* 284, 1365–1368.

Pascussi, J.M., Robert, A., Moreau, A., Ramos, J., Bioulac-Sage, P., Navarro, F., Blanc, P., Assenat, E., Maurel, P., and Vilarem, M.J. (2007). Differential regulation of constitutive androstane receptor expression by hepatocyte nuclear factor4alpha isoforms. *Hepatology* 45, 1146–1153.

Penz-Österreicher, M., Österreicher, C.H., and Trauner, M. (2011). Fibrosis in autoimmune and cholestatic liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25, 245–258.

Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* 26, 731–743.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.

Richter, T., Mürdter, T.E., Heinkele, G., Pleiss, J., Tatzel, S., Schwab, M., Eichelbaum, M., and Zanger, U.M. (2004). Potent mechanism-based inhibition of human CYP2B6 by clopidogrel and ticlopidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 189–197.

Rieger, J.K., Bodan D.A., Zanger, U.M. (2011). MIRNA-DISTILLER: a stand-alone application to compile microRNA data from databases. *Front. Gene.* 2, 39.

- Rogue, A., Lambert, C., Spire, C., Claude, N., and Guillouzo, A. (2012). Interindividual Variability in Gene Expression Profiles in Human Hepatocytes and Comparison with HepaRG Cells. *Drug Metab. Dispos.* *40*, 151–158.
- Roma, M.G., Toledo, F.D., Boaglio, A.C., Basiglio, C.L., Crocenzi, F.A., and Sánchez Pozzi, E.J. (2011). Ursodeoxycholic acid in cholestasis: linking action mechanisms to therapeutic applications. *Clin. Sci.* *121*, 523–544.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83–86.
- Rusca, N., and Monticelli, S. (2011). MiR-146a in Immunity and Disease. *Mol Biol Int* *2011*,.
- Schroepfer, G.J., Jr (2000). Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.* *80*, 361–554.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
- Sethupathy, P., Megraw, M., and Hatzigeorgiou, A.G. (2006). A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat. Methods* *3*, 881–886.
- Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G.A., and Meier, P.J. (2000). Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* *118*, 422–430.
- Strum, J.C., Johnson, J.H., Ward, J., Xie, H., Feild, J., Hester, A., Alford, A., and Waters, K.M. (2009). MicroRNA 132 Regulates Nutritional Stress-Induced Chemokine Production through Repression of SirT1. *Molecular Endocrinology* *23*, 1876–1884.
- Takagi, S., Nakajima, M., Kida, K., Yamaura, Y., Fukami, T., and Yokoi, T. (2010). MicroRNAs regulate human hepatocyte nuclear factor 4alpha, modulating the expression of metabolic enzymes and cell cycle. *J. Biol. Chem* *285*, 4415–4422.
- Takagi, S., Nakajima, M., Mohri, T., and Yokoi, T. (2008). Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4. *J. Biol. Chem* *283*, 9674–9680.
- Tie, J., and Fan, D. (2011). Big roles of microRNAs in tumorigenesis and tumor development. *Histol. Histopathol.* *26*, 1353–1361.
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Taniya, T., and Yokoi, T. (2006). MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* *66*, 9090–9098.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* *318*, 1931–1934.
- Wada, T., Gao, J., and Xie, W. (2009). PXR and CAR in energy metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 273–279.

- Wang, X. (2008). miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* 14, 1012–1017.
- Wang, Y., Rathinam, R., Walch, A., and Alahari, S.K. (2009). ST14 (suppression of tumorigenicity 14) gene is a target for miR-27b, and the inhibitory effect of ST14 on cell growth is independent of miR-27b regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 23094–23106.
- Wirsing, A., Senkel, S., Klein-Hitpass, L., and Ryffel, G.U. (2011). A Systematic Analysis of the 3'UTR of HNF4A mRNA Reveals an Interplay of Regulatory Elements Including miRNA Target Sites. *PLoS ONE* 6, e27438.
- Wu, L., Zhou, H., Lin, H., Qi, J., Zhu, C., Gao, Z., and Wang, H. (2011). Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe pre-eclamptic pregnancies. *Reproduction* (Cambridge, England).
- Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G., Kang, S., Gao, X., and Li, T. (2009). miRecords: an integrated resource for microRNA–target interactions. *Nucleic Acids Res* 37, D105–D110.
- Xu, J., Wu, C., Che, X., Wang, L., Yu, D., Zhang, T., Huang, L., Li, H., Tan, W., Wang, C., et al. (2011). Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol. Carcinog.* 50, 136–142.
- Yang, Z., and Wang, L. (2011). Regulation of microRNA expression and function by nuclear receptor signaling. *Cell Biosci* 1, 31.
- Yu, A.-M., Qu, J., Felmlee, M.A., Cao, J., and Jiang, X.-L. (2009). Quantitation of human cytochrome P450 2D6 protein with immunoblot and mass spectrometry analysis. *Drug Metab. Dispos.* 37, 170–177.
- Zamule, S.M., Strom, S.C., and Omiecinski, C.J. (2008). Preservation of Hepatic Phenotype in Lentiviral-Transduced Primary Human Hepatocytes. *Chem Biol Interact* 173, 179–186.
- Zavacki, A.M., Lehmann, J.M., Seol, W., Willson, T.M., Kliewer, S.A., and Moore, D.D. (1997). Activation of the orphan receptor RIP14 by retinoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 7909–7914.
- Zhou, C., Tabb, M.M., Nelson, E.L., Grün, F., Verma, S., Sadatrafiei, A., Lin, M., Mallick, S., Forman, B.M., Thummel, K.E., et al. (2006). Mutual repression between steroid and xenobiotic receptor and NF- κ B signaling pathways links xenobiotic metabolism and inflammation. *J Clin Invest* 116, 2280–2289.
- Zhu, A., Xia, J., Zuo, J., Jin, S., Zhou, H., Yao, L., Huang, H., and Han, Z. (2011). MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in gastric cancer. *Medical Oncology* (Northwood, London, England).
- Zollner, G., Wagner, M., and Trauner, M. (2010). Nuclear receptors as drug targets in cholestasis and drug-induced hepatotoxicity. *Pharmacol. Ther.* 126, 228–243.

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

7.1 Publikationen

2011 Juni **Rieger, J.K.**, Bodan D.A. Zanger, U.M

MIRNA-DISTILLER: a stand-alone application to compile microRNA data from databases.

Frontiers in Non-Coding RNA, 2, p.39.

7.2 Buchkapitel

2012 April Ulrich M. Zanger, Kathrin Klein, and **Jessica Rieger**

Importance of Pharmacogenomics

In: Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Auflage: 1. Auflage (18. April 2012)

7.3 SOP für das virtuelle Leber Datenmanagement

2011 März Maria Thomas, **Jessica Rieger**, Diana M. Feidt, Benjamin A. Kandel, Kathrin Klein, Ulrich M. Zanger

Introduction of shRNAs, miRNAs or anti-microRNAs into primary human hepatocytes with lentivirus.

7.4 Konferenzvorträge

2010 Mai **18th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Beijing, China**

Jessica K. Rieger, Denis A. Bodan Ulrich M. Zanger

MIRNA-DISTILLER, a New Software Tool to Facilitate microRNA

Bioinformatics: Application to ADME Genes



7.5 Posterpräsentationen

- 2009 Mai **11th European Regional ISSX Meeting, Lisboa, Portugal**
Jessica K. Rieger, Denis A. Bodan, Kathrin Klein, Matthias Schwab and
Ulrich M. Zanger:
**A Comparative Survey of ADME Genes for Potential microRNA
Interaction Based on Publically Available Databases.**
- 2011 April **77. Jahrestagung DGPT, Frankfurt, Germany**
Jessica K. Rieger, Denis A. Bodan, Matthias Schwab and Ulrich M. Zanger:
**MIRNA-DISTILLER, a New Software Tool to Facilitate microRNA
Bioinformatics: Application to ADME Genes**
- 2011 Oktober **17th North America ISSX Meeting, Atlanta, USA**
Benjamin A. Kandel; **Jessica K. Rieger**; Maria Thomas; Nina Hofmann;
Daniel Knobeloch; Ulrich M. Zanger
**Lentiviral Knock-down of the nuclear receptors CAR and PXR in human
hepatocytes**



8 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit, unter Einhaltung des §5(2) der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Tübingen, von mir eigenständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt wurde.

Jessica Karin Rieger



9 DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Professor Ulrich Zanger für die Bereitstellung eines interessanten und aktuellen Themas für meine Promotion bedanken. Dabei konnte ich sehr viel lernen und neue Ideen entwickeln, die immer gefördert und unterstützt wurden, was die Arbeit spannend und aufregend gestaltete. Auch die wissenschaftlichen Diskussionen waren stets hilfreich und motivierend.

Auch Professor Matthias Schwab danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation an dem Margarete Fischer-Bosch Institut für klinische Pharmakologie durchzuführen.

Bei Professor Stefan Laufer bedanke ich mich herzlich für die Bereitschaft, der Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation von Seiten der Eberhard Karl Universität Tübingen.

Bei Dr. Kathrin Klein bedanke ich mich ins Besondere für Ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in fachlichen und methodischen Fragen als auch für die vielen Tipps und Anregungen, wann immer ich sie gebraucht habe.

Auch bedanken möchte ich mich bei Dr. Maria Thomas für fachliche Diskussionen und der Hilfe bei der Anzeige meines S2 Projekts.

Des Weiteren möchte ich meiner gesamten Arbeitsgruppe für die schöne Zeit Danken. Dabei gilt besonderen Dank Britta Klumpp und Igor Liebermann für die technische Unterstützung und der Hilfe zur Erlernung sämtlicher Methoden. Aber auch Benjamin Kandel danke ich, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und vor allem bei S2 Arbeiten eine große Hilfe war und einen reibungslosen und optimierten Ablauf garantierte.

Auch bedanke ich mich bei meinen Kollegen im Büro und meiner Mittagsessenstruppe, für die entspannte Atmosphäre und die lustigen Momente, ohne Euch wäre die Zeit nicht halb so schön gewesen.

Meinem Partner Denis Bodan möchte ich für seine bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen danken, auf Ihn ist immer Verlass und es ist schön einen solchen Menschen an



seiner Seite zu wissen. Auch bei der Hilfe und der Programmierung von MIRNA-DISTILLER möchte ich an dieser Stelle danken und auch ein großes Lob aussprechen.

Besonderen Dank gilt meiner Familie, meinem Bruder Sebastian Rieger der immer für mich da ist und meinen Eltern Bettina und Ewald Rieger, die mir diesen Weg erst ermöglicht haben und mich dabei zu jeder Zeit unterstützt und ermutigt haben. Ich bin so stolz und froh Eltern wie euch zu haben.



10 ANHANG

Tabelle 30: MicroRNA Expressionen in Hepatozyten und in der Leber

Nicht detektiert		Hepatozyten	Leber	Hepatozyten	Leber	Hepatozyten	Leber
hsa-miR-892a	■	hsa-miR-219-1-3p	■	hsa-miR-95	■	hsa-miR-28-3p	■
hsa-miR-891b	■	hsa-miR-520g	■	hsa-miR-886-3p	■	hsa-miR-21	■
hsa-miR-891a	■	hsa-miR-522	■	hsa-miR-636	■	hsa-miR-486-5p	■
hsa-miR-890	■	hsa-miR-184	■	hsa-miR-218	■	hsa-miR-222	■
hsa-miR-888	■	hsa-miR-449b	■	hsa-miR-628-5p	■	hsa-miR-99a	■
hsa-miR-887	■	hsa-miR-548c-3p	■	hsa-miR-23a	■	hsa-miR-125b	■
hsa-miR-876-5p	■	hsa-miR-449a	■	hsa-miR-532-5p	■	hsa-miR-139-5p	■
hsa-miR-876-3p	■	hsa-miR-579	■	hsa-miR-29b	■	hsa-miR-26b	■
hsa-miR-875-3p	■	hsa-miR-412	■	hsa-miR-489	■	hsa-miR-150	■
hsa-miR-874	■	hsa-miR-137	■	hsa-miR-200a	■	hsa-miR-342-3p	■
hsa-miR-871	■	hsa-miR-198	■	hsa-miR-491-5p	■	hsa-let-7b	■
hsa-miR-674	■	hsa-miR-504	■	hsa-miR-339-3p	■	hsa-miR-146a	■
hsa-miR-672	■	hsa-miR-183	■	hsa-miR-130b	■	hsa-miR-19a	■
hsa-miR-654-5p	■	hsa-miR-423-5p	■	hsa-miR-340	■	hsa-miR-145	■
hsa-miR-653	■	hsa-miR-96	■	hsa-miR-335	■	hsa-miR-194	■
hsa-miR-651	■	hsa-miR-346	■	hsa-miR-324-3p	■	hsa-miR-146b-5p	■
hsa-miR-624	■	hsa-miR-520e	■	hsa-miR-486-3p	■	hsa-miR-484	■
hsa-miR-616	■	hsa-miR-502-5p	■	hsa-miR-15b	■	hsa-miR-30b	■
hsa-miR-615-5p	■	hsa-miR-508-3p	■	hsa-miR-125a-5p	■	hsa-miR-30c	■
hsa-miR-615-3p	■	hsa-miR-217	■	hsa-miR-744	■	hsa-miR-193b	■
hsa-miR-589	■	hsa-miR-519e	■	hsa-miR-133a	■	hsa-miR-320	■
hsa-miR-582-3p	■	hsa-miR-872	■	hsa-miR-185	■	hsa-miR-20a	■
hsa-miR-561	■	hsa-miR-520f	■	hsa-miR-127-3p	■	hsa-miR-885-5p	■
hsa-miR-556-5p	■	hsa-miR-369-5p	■	hsa-miR-134	■	hsa-miR-29a	■
hsa-miR-556-3p	■	hsa-miR-523	■	hsa-miR-532-3p	■	RNU44	■
hsa-miR-551b	■	hsa-miR-136	■	hsa-miR-204	■	hsa-miR-26a	■
hsa-miR-548d-3p	■	hsa-miR-450b-5p	■	hsa-miR-181a	■	hsa-miR-106a	■
hsa-miR-548c-5p	■	hsa-miR-502-3p	■	hsa-miR-494	■	hsa-miR-17	■
hsa-miR-548b-5p	■	hsa-miR-542-5p	■	hsa-miR-200c	■	hsa-miR-24	■
hsa-miR-548b-3p	■	hsa-miR-153	■	hsa-miR-28-5p	■	hsa-miR-192	■
hsa-miR-548a-5p	■	hsa-miR-202	■	hsa-let-7f	■	hsa-miR-574-3p	■
hsa-miR-548a-3p	■	hsa-miR-299-3p	■	hsa-miR-15a	■	hsa-miR-126	■
hsa-miR-544	■	hsa-miR-654-3p	■	hsa-miR-411	■	RNU48	■
hsa-miR-541	■	hsa-miR-518e	■	hsa-miR-328	■	hsa-miR-191	■
hsa-miR-526b	■	hsa-miR-873	■	hsa-let-7d	■	hsa-miR-16	■
hsa-miR-525-5p	■	hsa-miR-337-5p	■	hsa-miR-25	■	hsa-miR-122	■
hsa-miR-525-3p	■	hsa-miR-570	■	hsa-miR-203	■	hsa-miR-19b	■
hsa-miR-524-5p	■	hsa-miR-889	■	hsa-miR-10a	■	hsa-miR-223	■
hsa-miR-521	■	hsa-miR-576-3p	■	hsa-miR-483-5p	■		
hsa-miR-520d-5p	■	hsa-miR-642	■	hsa-miR-99b	■		
hsa-miR-520b	■	hsa-miR-381	■	hsa-miR-455-3p	■		
hsa-miR-520a-5p	■	hsa-miR-372	■	hsa-miR-34a	■		
hsa-miR-519d	■	hsa-miR-576-5p	■	hsa-miR-455-5p	■		
hsa-miR-519c-3p	■	hsa-miR-34c-5p	■	hsa-miR-375	■		
hsa-miR-519a	■	hsa-miR-124	■	hsa-miR-101	■		
hsa-miR-518d-5p	■	hsa-miR-503	■	hsa-miR-193a-5p	■		
hsa-miR-518c	■	hsa-miR-485-3p	■	hsa-miR-132	■		
hsa-miR-518a-5p	■	hsa-miR-548d-5p	■	hsa-miR-376c	■		
hsa-miR-518a-3p	■	hsa-miR-98	■	hsa-miR-103	■		
hsa-miR-517c	■	hsa-miR-190	■	hsa-miR-130a	■		

hsa-miR-517b	■	hsa-miR-542-3p	■	hsa-miR-590-5p	■
hsa-miR-517a	■	hsa-miR-501-5p	■	hsa-miR-106b	■
hsa-miR-516b	■	hsa-miR-520a-3p	■	hsa-miR-23b	■
hsa-miR-516a-5p	■	hsa-miR-135a	■	hsa-miR-660	■
hsa-miR-515-5p	■	hsa-miR-196b	■	hsa-miR-374a	■
hsa-miR-515-3p	■	hsa-miR-627	■	hsa-miR-422a	■
hsa-miR-513-5p	■	hsa-miR-211	■	hsa-miR-29c	■
hsa-miR-512-5p	■	hsa-miR-505	■	hsa-miR-27a	■
hsa-miR-512-3p	■	hsa-miR-125a-3p	■	hsa-miR-140-3p	■
hsa-miR-510	■	hsa-miR-1	■	hsa-let-7c	■
hsa-miR-509-5p	■	hsa-miR-885-3p	■	hsa-miR-345	■
hsa-miR-509-3-5p	■	hsa-miR-216b	■	hsa-miR-152	■
hsa-miR-508-5p	■	hsa-miR-216a	■	hsa-miR-200b	■
hsa-miR-507	■	hsa-miR-338-3p	■	hsa-miR-27b	■
hsa-miR-506	■	hsa-miR-671-3p	■	hsa-miR-93	■
hsa-miR-501-3p	■	hsa-miR-299-5p	■	hsa-miR-365	■
hsa-miR-499-5p	■	hsa-miR-545	■	hsa-miR-425	■
hsa-miR-499-3p	■	hsa-miR-363	■	hsa-miR-451	■
hsa-miR-496	■	hsa-miR-629	■	hsa-let-7a	■
hsa-miR-492	■	hsa-miR-758	■	hsa-miR-210	■
hsa-miR-491-3p	■	hsa-miR-22	■	hsa-miR-214	■
hsa-miR-490-3p	■	hsa-miR-383	■	hsa-miR-143	■
hsa-miR-488	■	hsa-miR-324-5p	■	hsa-miR-374b	■
hsa-miR-487a	■	hsa-miR-655	■	hsa-miR-92a	■
hsa-miR-485-5p	■	hsa-miR-146b-3p	■	hsa-miR-197	■
hsa-miR-453	■	hsa-miR-301b	■	hsa-miR-331-3p	■
hsa-miR-450b-3p	■	hsa-miR-182	■	hsa-miR-454	■
hsa-miR-450a	■	hsa-miR-539	■	hsa-miR-140-5p	■
hsa-miR-448	■	hsa-miR-330-3p	■	hsa-let-7e	■
hsa-miR-431	■	hsa-miR-652	■	hsa-let-7g	■
hsa-miR-409-5p	■	hsa-miR-31	■	hsa-miR-195	■
hsa-miR-384	■	hsa-miR-141	■	hsa-miR-100	■
hsa-miR-382	■	hsa-miR-518b	■	hsa-miR-142-3p	■
hsa-miR-380	■	hsa-miR-9	■	hsa-miR-199a-3p	■
hsa-miR-377	■	hsa-miR-625	■	hsa-miR-186	■
hsa-miR-376b	■	hsa-miR-495	■	hsa-miR-148a	■
hsa-miR-373	■	hsa-miR-582-5p	■		
hsa-miR-371-3p	■	hsa-miR-518f	■		
hsa-miR-370	■	hsa-miR-221	■		
hsa-miR-369-3p	■	hsa-miR-199b-5p	■		
hsa-miR-367	■	hsa-miR-18b	■		
hsa-miR-342-5p	■	hsa-miR-133b	■		
hsa-miR-33b	■	hsa-miR-886-5p	■		
hsa-miR-331-5p	■	hsa-miR-362-3p	■		
hsa-miR-330-5p	■	hsa-miR-597	■		
hsa-miR-329	■	hsa-miR-339-5p	■		
hsa-miR-326	■	hsa-miR-187	■		
hsa-miR-325	■	hsa-miR-410	■		
hsa-miR-302c	■	hsa-miR-181c	■		
hsa-miR-302b	■	hsa-miR-618	■		
hsa-miR-302a	■	hsa-miR-323-3p	■		
hsa-miR-298	■	hsa-miR-493	■		
hsa-miR-296-3p	■	hsa-miR-128	■		
hsa-miR-220c	■	hsa-miR-708	■		
hsa-miR-220b	■	hsa-miR-433	■		
hsa-miR-220	■	hsa-miR-107	■		
hsa-miR-219-5p	■	hsa-miR-487b	■		
hsa-miR-219-2-3p	■	hsa-miR-32	■		
hsa-miR-215	■	hsa-miR-500	■		
hsa-miR-208b	■	hsa-miR-135b	■		
hsa-miR-208	■	hsa-miR-18a	■		
hsa-miR-205	■	hsa-miR-518d-3p	■		

hsa-miR-188-3p	■	hsa-miR-361-5p	■	■			
hsa-miR-154	■	hsa-miR-199a-5p	■	■			
hsa-miR-147b	■	hsa-miR-148b	■	■			
hsa-miR-147	■	hsa-miR-452	■	■			
hsa-miR-129-5p	■	hsa-miR-142-5p	■	■			
hsa-miR-129-3p	■	hsa-miR-424	■	■			
hsa-miR-127-5p	■	hsa-miR-138	■	■			
hsa-miR-10b	■	hsa-miR-429	■	■			
hsa-miR-105	■	hsa-miR-139-3p	■	■			
hsa-miR-155	■	hsa-miR-362-5p	■	■			
ath-miR159a	■	hsa-miR-224	■	■			
		hsa-miR-301a	■	■			
		hsa-miR-511	■	■			
		hsa-miR-376a	■	■			
		hsa-miR-149	■	■			
		hsa-miR-598	■	■			
		hsa-miR-296-5p	■	■			
		hsa-miR-212	■	■			
		hsa-miR-193a-3p	■	■			
		hsa-miR-20b	■	■			
		hsa-miR-379	■	■			



Tabelle 31: MIRNA-DISTILLER Ausgabe: ADME Genset gefiltert nach Score>70, Leber/Hepatozyten exprimiert und von min. 2 Datenbanken vorhergesagt

Gen	microRNA	1	2	3	Gen	microRNA	1	2	3	Gen	microRNA	1	2	3	Gen	microRNA	1	2	3	
ABCB1	hsa-miR-455-3p	92	85		AHRR	hsa-miR-17	62		75	CYP3A4	hsa-miR-27a	60	80		CYP3A7	hsa-miR-410	88	85		
ABCB11	hsa-miR-22	79	85			hsa-miR-20b	62		75		hsa-miR-330-3p	63	90			hsa-miR-361-5p	89	85		
	hsa-miR-597	85	80			hsa-miR-193a-5p	64	85			hsa-miR-548d-5p	77	95	62		hsa-miR-548d-5p	96	95	69	
	hsa-miR-204	86	85			hsa-miR-93	65		74		hsa-miR-361-5p	82	85			hsa-miR-539	98		80	
	hsa-miR-211	86	90			hsa-miR-628-5p	69	80			hsa-miR-455-3p	84	85		FOXO1	hsa-miR-183	71		79	
	hsa-miR-543	99		82		hsa-miR-25	73	80			hsa-miR-539	94	85	67		hsa-miR-27a	75		61	
ABCC2	hsa-miR-340	83	85			hsa-miR-92a	75	80			hsa-miR-616	98		81		hsa-miR-27b	75		61	
	hsa-let-7a		80	60		hsa-miR-601	97		70		CYP3A43	hsa-miR-520g	87	85			hsa-miR-1270	76		61
	hsa-let-7d		80	60		ALDH2	hsa-miR-30b	97	80			71	hsa-miR-539	95		65	hsa-miR-548c-3p	84		61
	hsa-let-7e		85	60			hsa-miR-30c	97	80			72	hsa-miR-146b-5p	96	80		hsa-miR-570	88		69
	hsa-let-7f		85	60	hsa-miR-30d		97	80	75	hsa-miR-146a		96	85		hsa-miR-942	91		81		
	hsa-let-7c		85	61	hsa-miR-548c-3p		98		66	hsa-miR-573	99		76	hsa-miR-1269	96		98			
hsa-let-7b		90	63	CYP2E1	hsa-miR-539	93	85		CYP4F2	hsa-miR-136	81	85		hsa-miR-135a	99		62			
ABCG2	hsa-miR-20a	85		69	CYP1A1	hsa-miR-193a-5p	87	80			hsa-miR-193a-5p	87	80		hsa-miR-1276	99		80		
	hsa-miR-17	85		70	hsa-miR-196b	87		60		hsa-miR-501-5p	93		61	hsa-miR-223	91		75			
	hsa-miR-106b	85		71	CYP1B1	hsa-miR-432	87			61	hsa-miR-520g	98		63	hsa-miR-330-3p	87		62		
	hsa-miR-20b	85		72		hsa-miR-1179	92			60	hsa-let-7f	99	85	72	hsa-miR-324-3p	92		92		
	hsa-miR-93	90		71		hsa-miR-545	93		63	hsa-let-7d	99	85	73	hsa-miR-1271	97		92			
	hsa-miR-520g	98	85		hsa-miR-433	94		82	hsa-let-7e	99	85	73	GSTM1	hsa-miR-629	63	90				
	hsa-miR-302d	93		84	CYP2A6	hsa-miR-942	93		66	hsa-let-7a	99	85		74	hsa-miR-151-5p	74	80			
hsa-miR-520c-3p	93	80	84	CYP2B6	hsa-miR-548c-3p	91		79	hsa-let-7g	99	85	76	GSTP1	hsa-miR-133a	82	80				
ABCG5	hsa-miR-501-5p	82	85		hsa-miR-1179	98		65	hsa-let-7b	99		74		hsa-miR-24	71	85				
	hsa-miR-183	83	80	63	hsa-miR-590-3p	90		75	hsa-let-7c	99		75		hsa-miR-491-5p	73	80				
	hsa-miR-362-5p	85	85		CYP2C18	hsa-miR-576-3p	66	80		POR	hsa-miR-944	81	90	69	HMGCR	hsa-miR-139-5p	78		74	
	hsa-miR-192	90	80	65	CYP2C8	hsa-miR-125a-3p	78	85			DPYD	hsa-miR-376a	83	75		60	hsa-miR-29a	81	75	60
	hsa-miR-193a-5p	92	85		hsa-miR-34b	99	80	63		hsa-miR-17	91		60	hsa-miR-29c		81	75	60		
	hsa-miR-30c	97	80	76	CYP2C9	hsa-miR-125a-3p	73	85		hsa-miR-20a	91		65	hsa-miR-548c-3p		93		86		
	hsa-miR-30b	97	80	78		hsa-miR-552	77	80		hsa-miR-20b	91		65	hsa-miR-224	83		74			
hsa-miR-30d	97	80	81	hsa-miR-532-5p		90	85		hsa-miR-93	92		60	HNF4a	hsa-miR-216b	68		71			
hsa-miR-494	97		72	hsa-miR-143		93	80		hsa-miR-1271	98		62		hsa-miR-548c-3p	76		63			
ABCG8	hsa-miR-511	77	85			hsa-miR-374b	93	85		hsa-miR-425	99			65	hsa-miR-550	86	90			
	ACOX2	hsa-miR-590-3p	72		66	hsa-miR-374a	93	90		hsa-miR-494	99		86	NAT1	hsa-miR-223	62	85			
hsa-miR-409-3p		97	80		hsa-miR-494	93	90		hsa-miR-539	89			hsa-miR-203		87	90				
CRP	hsa-miR-570	97		67	hsa-miR-365	94	85		hsa-miR-1276	87			hsa-miR-320b	93		84				

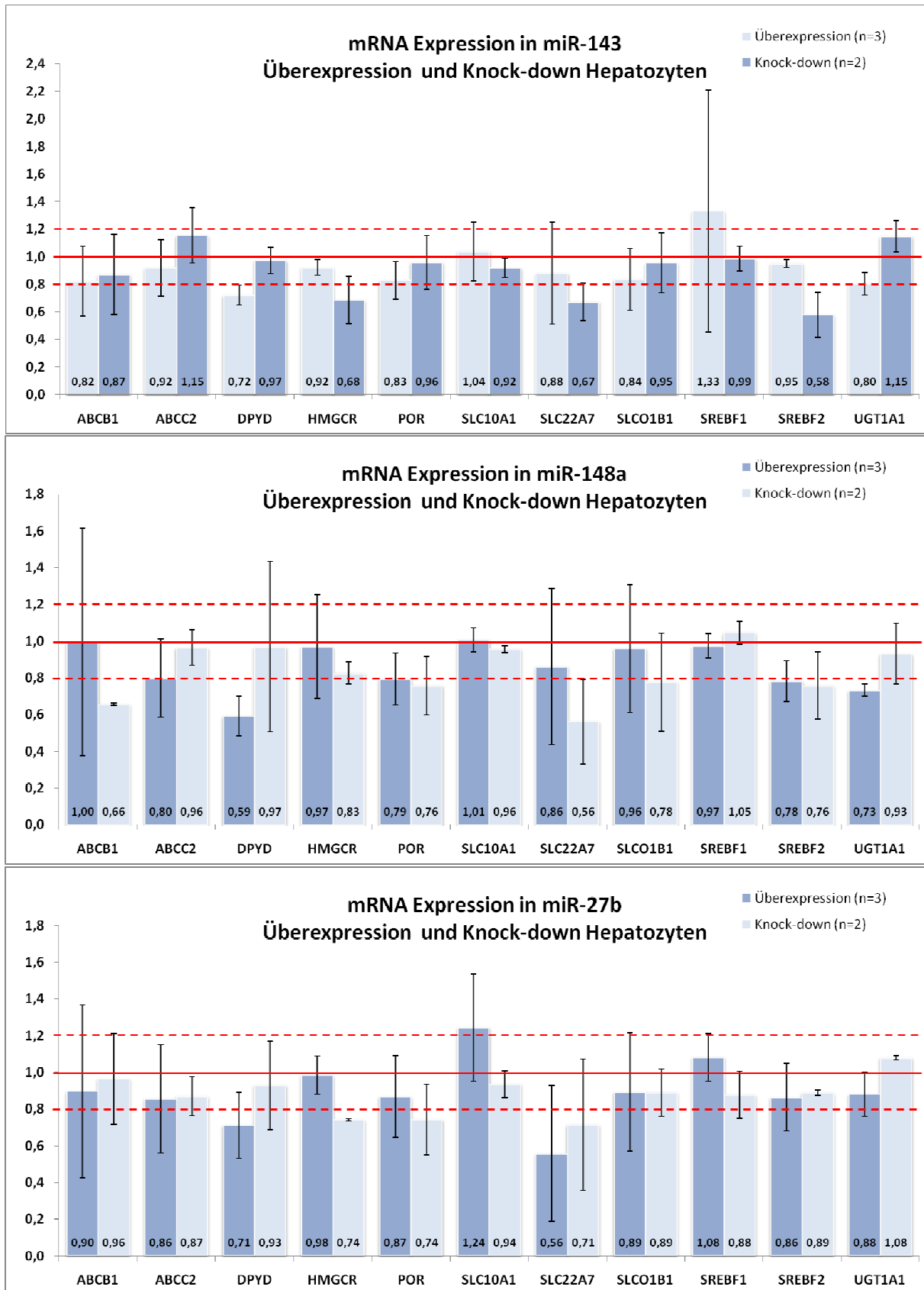


Abbildung 48: Andere mit dem ADME Array gemessene Genexpressionen (n-fach) nach microRNA Überexpression und Knock-down in Hepatozyten, 120h nach lentiviraler Infektion.