

# **Regulation des Arzneistoffmetabolismus durch nukleäre Rezeptoren und microRNAs bei Entzündung**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
M.Sc. Nicole Kugler, geb. Knapp  
aus Ludwigsburg

Tübingen  
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

28.05.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Ulrich M. Zanger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Robert Lukowski

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VII</b>
<b>Summary .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Arzneistoffmetabolismus in der Leber .....	1
1.1.1 Allgemeine Grundlagen des Arzneistoffmetabolismus .....	1
1.1.2 Variabilität im Arzneistoffmetabolismus .....	2
1.1.3 Regulation des Arzneistoffmetabolismus .....	4
1.2 Entzündung .....	6
1.2.1 Akut-Phase-Reaktion .....	7
1.2.2 Mechanismen der Herunterregulierung von ADME-Genen .....	8
1.3 MicroRNAs .....	14
1.3.1 Biogenese und Wirkung von microRNAs .....	14
1.3.2 MicroRNAs als negative Regulatoren von ADME-Genen .....	19
1.4 Hepatische Zellmodelle .....	19
1.4.1 Primäre Hepatozyten.....	20
1.4.2 Hepatische Zelllinien .....	21
1.5 Ziele der Arbeit .....	22
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Material.....	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Puffer und Lösungen .....	24
2.1.3 Kits.....	25
2.1.4 Geräte.....	26
2.1.5 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.6 TaqMan®-Assays.....	27
2.1.7 MiRNA-Mimics und -Antagomirs .....	28
2.1.8 Antikörper .....	29
2.1.9 Zelllinien und Zellkulturmedien.....	29
2.1.10 Zellkulturmedien .....	30
2.1.11 Plasmide.....	30
2.1.12 Software und Datenbanken.....	33
2.2 Methoden.....	35
2.2.1 Zellkultur-Methoden.....	35
2.2.1.1 Primäre humane Hepatozyten.....	35
2.2.1.2 Kryokonservierte humane Hepatozyten .....	35
2.2.1.3 HepaRG-Zellen.....	36
2.2.1.4 HepG2- und Huh7-Zellen .....	37
2.2.1.5 Behandlungen mit Cytokinen .....	37
2.2.1.6 Behandlungen mit Acriflavin .....	37
2.2.1.7 Zellviabilitätstests .....	38
2.2.1.7.1 LDH-Assay .....	38
2.2.1.7.2 Alamar-Blue-Assay.....	38
2.2.1.8 Transfektion mit miRNA-Mimics/Antagomirs.....	39
2.2.2 Leberbank.....	39
2.2.2.1 Sammlung der Lebergewebeproben .....	39
2.2.2.2 Generierung der Leberbankpools.....	40
2.2.2.3 Korrelationsanalyse zwischen miRNA-Expression und CYP-Phänotypen .....	40

2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	41
2.2.3.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung.....	41
2.2.3.1.1 RNA-Isolierung aus Zellen .....	41
2.2.3.1.2 RNA-Isolierung aus Gewebe.....	41
2.2.3.2 MiRNA Profiling – Microarray-Analysen.....	42
2.2.3.2.1 Probenvorbereitung.....	42
2.2.3.2.2 Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes.....	42
2.2.3.2.3 FlashTag™ Biotin HSR Ligation.....	43
2.2.3.2.4 Hybridisierung.....	43
2.2.3.2.5 Waschen und Färben der Arrays .....	44
2.2.3.2.6 Analyse der Microarraydaten .....	44
2.2.3.3 Genexpressionsanalyse .....	45
2.2.3.3.1 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription .....	45
2.2.3.3.2 Präamplifizierung der cDNA .....	46
2.2.3.3.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) .....	46
2.2.3.4 Luciferase-Reportergen-Konstrukte .....	49
2.2.3.4.1 Erstellung der Luciferase-Reportergen-Konstrukte.....	49
2.2.3.4.2 Kotransfektion der Luciferase-Reportergen-Konstrukte mit miRNA-Mimics in Huh7-Zellen.....	51
2.2.3.4.3 Aktivitätsmessung der Luciferase-Reportergen-Konstrukte.....	52
2.2.4 In silico Methoden .....	53
2.2.4.1 Vorhersage von Targetgenen.....	53
2.2.5 Biochemische Methoden .....	55
2.2.5.1 Proteinlysate.....	55
2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	56
2.2.5.3 Behandlung mit PNGase F.....	56
2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	56
2.2.5.4.1 1D-Gele .....	56
2.2.5.4.2 2D-Gele .....	57
2.2.5.5 Western Blot .....	58
2.2.5.5.1 1D-Western Blot .....	58
2.2.5.5.2 2D-Western Blot .....	59
2.2.6 Analytische Methoden .....	60
2.2.6.1 Aktivitätsmessungen der Cytochrom-P450-Enzyme mit einem auf Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie basierenden Substrat-Cocktail-Assay in Zellen .....	60
2.2.6.2 Aktivitätsmessungen der Cytochrom-P450-Enzyme mit einem auf Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie basierenden Substrat-Cocktail-Assay in Lebermikrosomen .....	61
2.2.7 Statistische Methoden .....	62
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.1 Evaluation hepatischer Zellmodelle für den Arzneistoffmetabolismus.....	63
3.1.1 Übersicht und Morphologie der hepatischen Zellmodelle .....	63
3.1.2 Cytochrom-P450-Enzymaktivitäten der hepatischen Zellmodelle.....	64
3.1.3 Akut-Phase-Reaktion und Induzierbarkeit von CYP-Enzymaktivitäten in den hepatischen Zellmodellen.....	67
3.1.4 Transfektionseffizienz in den hepatischen Zellmodellen.....	69
3.2 Rolle von nukleären Rezeptoren bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung .....	72
3.2.1 Einfluss von Cytokinen auf die Cytochrom-P450-Enzymaktivität .....	73
3.2.2 Einfluss von Cytokinen auf die Expression von RXRα.....	74
3.2.2.1 Einzelbehandlungen von Cytokinen .....	74
3.2.2.2 Kombinationsbehandlungen von Cytokinen .....	75

# Inhaltsverzeichnis

---

3.2.2.3 Induktion von post-translationalen Modifikationen .....	76
3.2.3 Einfluss von Cytokinen auf die Expression von PXR .....	78
3.3 Rolle von entzündungsassoziierten microRNAs in der ADME-Genregulation.....	80
3.3.1 Identifizierung von funktionalen microRNA-Bindestellen in ADME-Genen.....	80
3.3.2 MicroRNA-Effekte auf die ADME-Genexpression.....	83
3.3.3 MicroRNA-Effekte auf die Cytochrom-P450-Enzymaktivität .....	88
3.3.4 Korrelationen von entzündungsassoziierten microRNAs mit ADME-Genen .....	91
3.4 Herkunft von entzündungsassoziierten microRNAs.....	92
3.4.1 Induzierbarkeit von microRNAs durch Cytokine in HepaRG-Zellen.....	93
3.4.2 Regulation von funktionalen microRNA-Bindestellen in ADME-Genen durch cytokinininduzierte microRNAs .....	96
3.4.3 Inhibierung der endogenen microRNA-Funktion durch Antagomir-Transfektionen .	100
3.4.4 Inhibierung der endogenen microRNA-Funktion durch Acriflavin .....	101
3.4.4.1 Auswirkungen von Acriflavin auf die Akut-Phase-Reaktion .....	101
3.4.4.1.1 Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Acriflavin und Cytokinen auf die CYP-Enzymaktivität.....	101
3.4.4.1.2 Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Acriflavin und Cytokinen auf die CYP-Proteinexpression .....	104
3.4.4.1.3 Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Acriflavin und Cytokinen auf die ADME-Genexpression.....	105
3.4.4.2 Auswirkungen von Acriflavin auf ADME-Gene .....	107
3.4.4.2.1 Wirkung von Acriflavin auf die Zellviabilität .....	107
3.4.4.2.2 Wirkung von Acriflavin auf die ADME-Genexpression .....	109
3.4.4.2.3 Wirkung von Acriflavin auf die CYP-Enzymaktivität .....	111
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>115</b>
4.1 Evaluation hepatischer Zellmodelle für den Arzneistoffmetabolismus.....	115
4.2 Rolle von nukleären Rezeptoren bei der Herunterregulierung von ADME-Genen .....	119
4.2.1 Rolle von RXR $\alpha$ .....	120
4.2.2 Rolle von nukleären Rezeptoren .....	122
4.3 Einfluss von entzündungsassoziierten microRNAs auf die ADME Expression .....	123
4.3.1 Effekte von einzelnen microRNAs.....	123
4.3.2 MicroRNAs – stärker im Verbund? .....	126
4.3.3 Beitrag von microRNAs zur negativen Akut-Phase-Reaktion .....	128
4.4 Herkunft von entzündungsassoziierten microRNAs.....	129
4.4.1 Induktion von entzündungsassoziierten miRNAs durch Cytokine in Hepatozyten?	129
4.4.2 Wirkung von endogenen microRNAs bei der Akut-Phase-Reaktion.....	132
4.4.3 Rolle von Acriflavin – ein CYP-Inhibitor? .....	134
4.5 Potenzielle Biomarker: MicroRNAs als frühe Prädiktoren für das Ansprechen von Medikamenten bei Entzündung? .....	135
4.6 Fazit und Ausblick .....	136
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>139</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>163</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>165</b>



## Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	<i>3'-untranslated region</i> , 3'-untranslatierter Bereich
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Alkoholdehydrogenase
ADME	Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion
AF	Acriflavin
AGO	Argonaut
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AIDS	Erworbenes Immunschwächesyndrom
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APP	Akut-Phase-Protein
APR	Akut-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serumalbumin
CAR	Konstitutiver Androstanrezeptor
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>
CNV	<i>Copy number variation</i> , Kopienzahlvariation
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P450
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kalbserum
FMO	Flavinhaltige Monooxygenase
FXR	Farnesoid X Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GST	Glutathion-S-Transferase
HDAC	Histondeacetylase
HNF	<i>Hepatocyte nuclear factor</i>
Hp	Haptoglobin
HSP	Hitzeschockprotein
IFC	<i>Integrated fluid circuit</i>
IFN	Interferon
IKP	Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie
IL	Interleukin
JAK	Januskinase
KHH	Kryokonservierte humane Hepatozyten
KO	<i>Knockout</i>
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Leber X Rezeptor
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute(n)
miRNA/miR	MicroRNA
MRE	<i>MiRNA response element</i>
NASH	Nichtalkoholische Steatohepatitis
NAT	N-Acetyltransferase
NCoR	<i>Nuclear receptor co-repressor</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NR	Nukleärer Rezeptor
nt	Nukleotid

## Abkürzungsverzeichnis

---

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGC	PPAR $\gamma$ Koaktivator
PHH	Primäre humane Hepatozyten
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
POR	Cytochrom-P450-Reduktase
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
pre-miRNA	<i>Precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>Primary</i> miRNA
PXR	Pregnan-X-Rezeptor
qRT-PCR	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RIN	RNA Integrity Number
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SAA	Serumamyloid A
siCTR	SiRNA-Kontrolle
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
SLC	<i>Solute carrier transporter</i>
SMRT	<i>Silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors</i>
SRC	Steroidrezeptor Koaktivator
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPMT	Thiopurinmethyltransferase
UGT	Uridindiphosphat-Glucuronosyltransferase



### Zusammenfassung

Entzündliche Bedingungen, ausgelöst z. B. durch eine Infektion oder eine Gewebsverletzung, führen zu einer starken Beeinträchtigung des Arzneistoffmetabolismus. Dabei kommt es in der Leber zu einer koordinierten Herunterregulierung der Enzyme und Transporter, die an der Absorption, der Distribution, dem Metabolismus und der Exkretion (ADME) von Fremdstoffen (Xenobiotika) beteiligt sind, z. B. Cytochrome P450 (CYP). Lipophile Medikamente können durch die geringe Exkretion im Körper akkumulieren und bei geringer therapeutischer Breite zu schwerwiegenden Toxizitätserscheinungen bei Patienten führen. Einige an der Herunterregulierung beteiligte Mechanismen wurden bereits untersucht. Wichtige Ansatzpunkte sind nukleäre Rezeptoren (NR), z. B. der Pregnan-X-Rezeptor (PXR), und ihr Bindungspartner Retinoid-X-Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), welche hauptsächlich an der induzierbaren Expression der CYPs beteiligt sind. Jedoch war unklar, inwieweit die bisher bekannten Mechanismen zu der immensen und koordinierten Herunterregulierung von ADME-Genen beitragen und ob nicht weitere unbekannte Mechanismen eine Bedeutung haben könnten. Da microRNAs (miRNAs) als post-transkriptionelle Regulatoren mit überwiegend negativem Einfluss auf die Expression zahlreicher Gene bekannt sind und bereits entzündungsassoziierte miRNAs identifiziert worden waren, sollte in dieser Arbeit ihre Rolle bei der entzündungsvermittelten Herunterregulierung der ADME-Gene systematisch analysiert werden.

Als Modell für die experimentelle Untersuchungen wurden zunächst die Eigenschaften von kryokonservierten humanen Hepatozyten (KHH) aus gepoolten Donoren mit denen primärer humaner Hepatozyten (PHH) und HepaRG-Zellen, einer hepatischen Stammzelllinie mit metabolischer Funktion, verglichen. Dabei zeigten KHH nicht die erwartete Reproduzierbarkeit, insbesondere in Bezug auf das Verhalten der CYP-Enzymaktivitäten. Daher und wegen der limitierten Verfügbarkeit von PHH wurden für weitere Experimente HepaRG-Zellen verwendet. Diese erwiesen sich als ein robustes Zellmodell hinsichtlich der CYP-Enzymaktivitäten und Reproduzierbarkeit von entzündungsrelevanten Bedingungen. Um die Rolle von NR näher zu beleuchten, wurde die Wirkung von proinflammatorischen Cytokinen vor allem auf das Proteinverhalten von NR untersucht. Unter Cytokineinfluss kam es in HepaRG-Zellen bei RXR $\alpha$  zu einer teilweisen Proteinabnahme (um 30-50 %), während es bei PXR zu einer langandauernden, 50%igen Abnahme des Proteins kam. Cytokinkombinationen wirkten sich kombinatorisch auf die CYP-Enzymaktivitäten aus, wohingegen dies bei RXR $\alpha$  und PXR nicht der Fall war. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass NR

vermutlich nicht als alleiniger Mechanismus für die Herunterregulierung von ADME-Genen gelten können.

Daher wurden miRNAs als eine zusätzliche, neuartige Regulationsebene bei der Herunterregulierung von ADME-Genen untersucht. Die Identifizierung von entzündungs-assoziierten miRNAs war bereits in der vorangegangenen Masterarbeit anhand des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) in Lebergewebe systematisch durchgeführt worden. Hier wurden nun diese miRNAs aufgrund von Bindungsvorhersagen klassifiziert und selektioniert. Der Einfluss von miR-155-5p, miR-224-5p, miR-452-5p, miR-543 und miR-6807-5p wurde genauer untersucht. Vor allem miR-155-5p und miR-452-5p zeigten in HepaRG-Zellen starke Auswirkungen auf die Expression einiger ADME-Gene, sowohl auf mRNA- und Aktivitätsebene (je nach Gen Abnahme um 20-45 %). Mehrere funktionale Bindestellen dieser entzündungsassoziierten miRNAs wurden mittels Luciferase-Reporter-Assays in verschiedenen ADME-Genen validiert: RXR $\alpha$  (miR-130b-3p), CYP2C8 (miR-452-5p), CYP2C9 (miR-155-5p), CYP2C19 (miR-155-5p, miR-6807-5p) und CYP3A4 (miR-224-5p). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese miRNAs *in vitro* auch kombinatorische Effekte auf ADME-Gene zeigten und somit bei Entzündungen in einem Netzwerk organisiert sein können. Zwischen hepatischer Expression dieser miRNAs und einigen CYP-Phänotypen wurden teils erhebliche negative Korrelationen beobachtet, in Übereinstimmung mit einem möglichen *in vivo* Einfluss.

Um die Herkunft entzündungsassoziiierter miRNAs zu untersuchen, wurden HepaRG-Zellen mit Cytokinen behandelt. Dies führte zu positiven und negativen Expressionsänderungen einer Vielzahl von miRNAs. Von den hier untersuchten miRNAs wurde miR-6807-5p sowohl von Interleukin-6 (IL-6) als auch IL-1 $\beta$  dereguliert. Dies ist in Übereinstimmung mit einer zumindest teilweisen Herkunft aus Hepatozyten, während miR-155-5p und die anderen hier untersuchten miRNAs wohl eher aus Makrophagen (z. B. Kupffer-Zellen, „parakrin“) oder aus der Blutzirkulation („endokrin“) stammen. Die Substanz Acriflavin verhinderte die absenkende Wirkung von IL-6 auf ADME-Gene, nicht jedoch diejenige von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Diese Effekte können nicht allein auf der beschriebenen Wirkung von Acriflavin als genereller miRNA-Inhibitor beruhen, sondern deuten vielmehr auf eine Interaktion mit Cytokin-Signalwegen hin.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei Entzündung in der Leber vorhandene miRNAs in der Lage sind, ADME-Gene negativ zu regulieren. MiRNAs können ADME-Gene *in vitro* sowohl direkt als auch indirekt über RXR $\alpha$  regulieren. Dies und die beobachteten Korrelationen in *ex vivo* Lebergewebe weisen darauf hin, dass miRNAs an der koordinierten Herunterregulierung der ADME-Gene auch *in vivo*

beteiligt sind. Langfristig könnten sie ein Angriffsziel für Medikamente sein, um den negativen Einfluss von miRNAs auf ADME-Gene zu reduzieren. Eventuell könnten sie sich als Biomarker eignen, um den Einfluss von entzündlichen Bedingungen auf den Arzneistoffmetabolismus vorherzusagen.



### Summary

Inflammation triggered by infection or tissue damage leads to an impaired hepatic detoxification due to the coordinated downregulation of enzymes and transporters involved in the absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of foreign substances (xenobiotics), such as cytochromes P450 (CYPs). Lipophilic drugs may accumulate within the body due to the decreased excretion and provoke due to a narrow therapeutic index harmful toxicities in patients. Several mechanisms involved in the downregulation have been investigated. Important starting points are nuclear receptors (NRs), such as pregnane X receptor (PXR), and their binding partner retinoid X receptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) which are mainly involved in the inducible CYP expression. However, it has not been clarified so far to which extent the known mechanisms are responsible for the immense and coordinated downregulation of ADME genes and whether further unknown mechanisms are involved. Since microRNAs (miRNAs) can affect expression of various genes negatively as post-transcriptional regulators and inflammation-associated miRNAs have already been identified, their role in the inflammation-related downregulation should be investigated systematically.

As a model for experimental investigations the properties of cryo-conserved hepatocytes (CCHs) pooled from different donors, whose generation was established some time ago, were first compared to those of primary human hepatocytes (PHHs) and HepaRG cells, a hepatic stem cell line with metabolic function. CCHs did not show the expected reproducibility especially in terms of the behavior of CYP activities. Therefore, and due to the limited availability of PHHs HepaRG cells were used for further experiments. They proved to be a robust cell model in terms of CYP activities and reproducibility of inflammatory conditions.

To further explore the role of NRs, the effects of proinflammatory cytokines were studied especially on protein behavior. RXR $\alpha$  showed a partial protein decrease in HepaRG cells (around 30-50 %); while PXR showed a prolonged protein decrease around 50 %. Cytokine combinations had combinatory effects on CYP enzyme activities, whereas this was not the case for RXR $\alpha$  and PXR. These results indicate that probably NRs might not be an exclusive mechanism for the downregulation of ADME genes.

Therefore, miRNAs were investigated as an additional novel regulation layer in the downregulation of ADME genes. The identification of inflammation-associated miRNAs had already been conducted systematically in liver tissue based on inflammation marker C-reactive protein (CRP) in the preceding master thesis. Here these miRNAs

were classified and selected for binding predictions. The influence of miR-155-5p, miR-224-5p, miR-452-5p, miR-543 und miR-6807-5p was investigated more detailed. Especially miR-155-5p and miR-452-5p showed strong effects on ADME expression on both mRNA and activity level (decrease of 20-45 % depending on gene) Several functional binding sites of inflammation-associated miRNAs were validated in ADME genes using luciferase reporter assays: RXR $\alpha$  (miR-130b-3p), CYP2C8 (miR-452-5p), CYP2C9 (miR-155-5p), CYP2C19 (miR-155-5p, miR-6807-5p) and CYP3A4 (miR-224-5p). Additionally, these miRNAs showed combinatory effects on ADME genes *in vitro* suggesting that they are organized in a network during inflammation. Strong negative correlations were observed between the hepatic expression of these miRNAs and several CYP phenotypes, which was in conclusion with a potential *in vivo* influence.

To investigate the origin of inflammation-associated miRNAs, HepaRG cells were treated with cytokines. This led to positive and negative expression changes of a multitude of miRNAs. MiR-6807-5p was one of the here analyzed miRNAs that was deregulated by both interleukin-6 (IL-6) and IL-1 $\beta$ . This is in accordance with a partial origin of hepatocytes; whereas miR-155-5p and the other here investigated miRNAs rather derive from macrophages (e. g. Kupffer cells, „paracrine“) or blood circulation („endocrine“). The substance acriflavine prevented the reducing effect of IL-6 on ADME genes, but not of IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). These effects cannot be based solely on the described effect of acriflavine as a general miRNA inhibitor, but point rather to an interaction with cytokine signaling pathways.

In summary, it was shown that during inflammation miRNAs which are present in the liver are able to regulate ADME genes negatively. MiRNAs regulate ADME genes *in vitro* directly and indirectly via RXR $\alpha$ . This and the observed negative correlations in *ex vivo* liver tissue could be a hint that miRNAs are also involved in the coordinated downregulation of ADME genes *in vivo*. In the long term miRNAs may offer a target for drugs reducing the negative effects of miRNAs on ADME genes. Potentially they may serve as biomarkers to predict the influence of inflammation on drug metabolism.

# 1. Einleitung

## 1.1 Arzneistoffmetabolismus in der Leber

### 1.1.1 Allgemeine Grundlagen des Arzneistoffmetabolismus

Zahlreiche Medikamente besitzen lipophile Eigenschaften, welche ihre Aufnahme in den Körper erleichtern. Allerdings erschwert dies eine Ausscheidung der Stoffe über die Niere. Die Leber besitzt eine große Batterie an Enzymen und Transportern, die an der Absorption, der Distribution, dem Metabolismus und der Exkretion (ADME) von Medikamenten beteiligt ist, um die Ausscheidung von Fremdstoffen (Xenobiotika) zu gewährleisten (Zanger 2012).

Als Arzneistoffmetabolismus wird der Prozess der Biotransformation von pharmazeutischen Substanzen und Xenobiotika durch bestimmte Enzymsysteme bezeichnet (Anzenbacher und Zanger 2012). Dieser Prozess lässt sich in drei Phasen einteilen: In der Phase I werden an lipophilen Substanzen funktionelle Gruppen wie Hydroxy (-OH), Sulfhydryl (-SH), Carboxyl (-COOH) und Amin (-NH<sub>2</sub>) angehängt oder freigesetzt. In der Phase II werden Produkte der Phase I durch Konjugation mit Glucuronsäure, Glutathion oder anderen für eine bessere Exkretion in wasserlösliche Stoffe umgewandelt. Als Phase III werden Transportvorgänge bezeichnet, die für die Aufnahme und Exkretion der Stoffe und ihrer Metaboliten verantwortlich sind. Die Aufnahme von Stoffen wird oftmals auch als Phase 0 bezeichnet. Allerdings trifft diese Einteilung nicht immer auf alle Substanzen zu (Anzenbacher und Anzenbacherová 2012; Peng und Zhong 2015). Nach der Biotransformation ist eine effiziente Eliminierung der nun hydrophilen Substanzen durch die Niere sichergestellt (Zanger 2012).

In Phase I sind hauptsächlich Cytochrom-P450-Monooxygenasen (CYP) an der Metabolisierung von Xenobiotika beteiligt. Sie metabolisieren ca. 80 % der verschriebenen Medikamente (Zanger et al. 2008). Des Weiteren sind Alkoholdehydrogenasen (ADH), flavinhaltige Monooxygenasen (FMO) und Aldehyddehydrogenasen (ALDH) involviert. In Phase II sorgen UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Glutathion-S-Transferasen (GST), Sulfotransferasen (SULT), N-Acetyltransferasen (NAT), Thiopurinmethyltransferasen (TPMT) und Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) für die Umwandlung der Phase I-Produkte. In Phase III spielen verschiedene Transportergruppen wie *solute carrier transporter* (SLC) und *ATP-binding cassette transporter* (ABC) eine Rolle (Schlessinger et al. 2013; Dean und Annilo 2005; Nies et al. 2015). Die CYPs bilden mit 57 Mitgliedern im Menschen

eine große Enzymfamilie, die zu den Häm-Proteinen gehört. Der Familienname Cytochrom P450 (P für Pigment) leitet sich von dem 1963 entdeckten CO-Differenzspektrum bei 450 nm ab (Omura und Sato 1963). Die CYPs werden in 18 Familien und 43 Unterfamilien, welche auf Sequenzähnlichkeit beruhen, eingeteilt (Zanger und Eichelbaum 2008). In Wirbeltieren existieren zwei CYP-Formen: eine befindet sich in der inneren Membran von Mitochondrien und die andere im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Zanger und Eichelbaum 2008). Außerdem werden einige CYPs wie CYP2J2, 1A1 und 1B1 außerhalb der Leber exprimiert (Zanger und Schwab 2013).

Die Hauptfunktion der CYPs ist die Katalyse von Oxidationsreaktionen, in denen molekularer Sauerstoff gespalten wird. Dabei wird ein Sauerstoffatom an das Substrat angehängt, während das zweite Sauerstoffatom in Wasser eingebracht wird. Die NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (POR) wirkt über die Reduktion von NADPH als Elektronendonator für CYPs, während bei mitochondrialen CYPs die NADPH-Adrenodoxin-Reduktase zusammen mit Adrenodoxin den Elektronentransfer übernehmen (Zanger und Eichelbaum 2008; Guengerich 2012).

Im Arzneistoffmetabolismus sind vor allem die Familien CYP1, CYP2 und CYP3 involviert, während die Familien CYP4-51 an der Produktion von Steroidhormonen, Gallensäuren und Prostaglandinen in der Leber beteiligt sind (Zanger und Eichelbaum 2008). Sie besitzen eine breite und überlappende Substratspezifität (Zanger et al. 2008). Die Hauptaufgabe ist die Entgiftung des Körpers von Xenobiotika. Dennoch können CYPs aber auch zu einer gewünschten Aktivierung von Medikamenten (Prodrug, z. B. Cyclophosphamid) oder der Entstehung von Prokarzinogenen (z. B. Benzo[a]pyrene) beitragen, wobei toxische Metabolite entstehen können. Die bedeutendsten CYPs für den Arzneistoffmetabolismus sind CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2 und 3A4/5. CYP3A4/5 leisten mit 30 % den größten Anteil des Arzneistoffmetabolismus (Zanger und Schwab 2013; Zanger et al. 2014). Die CYPs 3A4, 2C9, 1A2 und 2E1 sind die am stärksten exprimierten Isoformen in der Leber, wohingegen ihre Beteiligung am Arzneistoffmetabolismus aufgrund ihrer Substratspezifität sich anders verhält. CYP2E1 trägt z. B. trotz seiner hohen Expression nur 3 % zum Arzneistoffmetabolismus bei (Zanger et al. 2014).

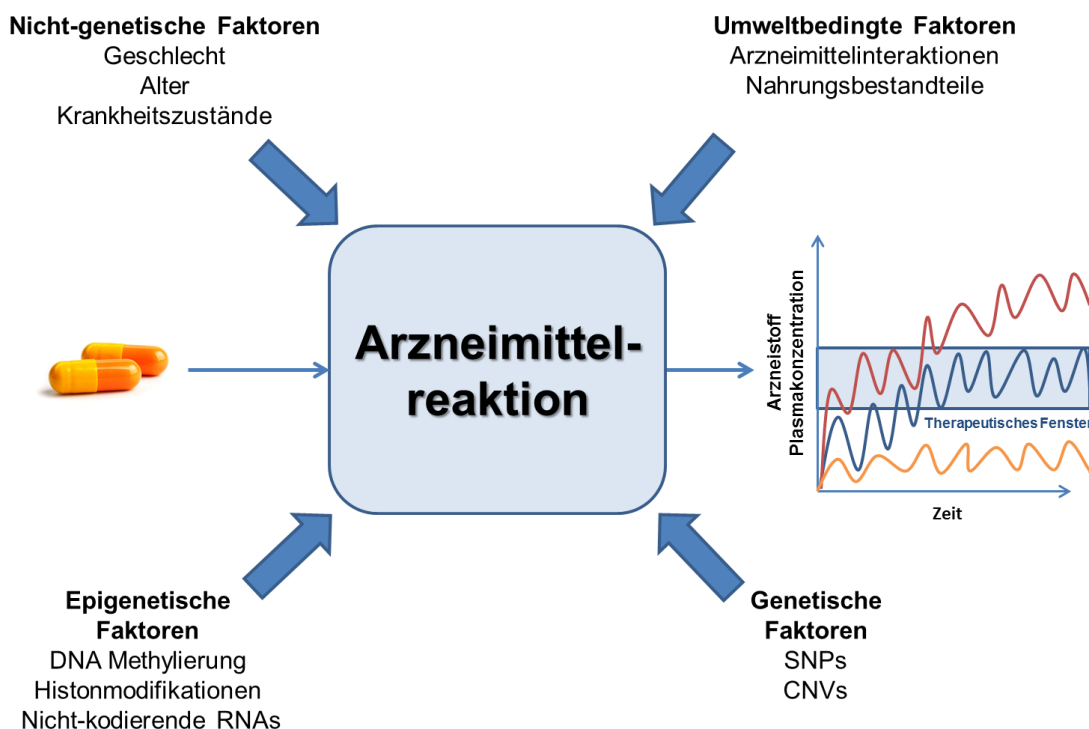
### **1.1.2 Variabilität im Arzneistoffmetabolismus**

Bei einer medikamentösen Therapie kann es durch verschiedene Faktoren zu unterschiedlichem Ansprechen der Patienten auf das gleiche Medikament kommen (Abb. 1). Dies liegt vor allem an der Variabilität der ADME-Gene. Einige



## 1. Einleitung

Arzneistoffmetabolisierende Enzyme weisen eine hohe inter- und intraindividuelle Variabilität auf, die durch genetische und nicht-genetische Faktoren bedingt ist (Zanger et al. 2014). Zu den genetischen Faktoren, die den Arzneistoffmetabolismus beeinflussen können, gehören Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) und Kopienzahlvariationen (CNV, *copy number variation*). In den letzten Jahren haben auch epigenetische Faktoren wie die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und nicht-kodierende RNAs an Bedeutung gewonnen (Zanger und Schwab 2013; Fisel et al. 2016). Darüber hinaus spielen auch nicht-genetische Faktoren - wie das Geschlecht, Alter und Krankheitszustände - eine Rolle. Ebenso können sich durch das Umfeld bedingte Faktoren auf den Arzneistoffmetabolismus auswirken. Dazu gehören Arzneimittelinteraktionen und Nahrungsbestandteile wie Grapefruitsaft und Brokkoli (Zanger und Schwab 2013). Letztendlich beeinflussen diese Faktoren nicht nur das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie, sondern sie können auch zu Toxizitätserscheinungen und Nebenwirkungen bei Medikamenten mit einer geringen therapeutischen Breite führen (Zanger 2012).



**Abb. 1: Faktoren, die den Arzneistoffmetabolismus beeinflussen.** Bei einer medikamentösen Therapie wird das Ansprechen durch verschiedene Faktoren beeinflusst und kann zu einer Variabilität im Arzneistoffmetabolismus führen. Patienten können durch diese Faktoren unter Umständen nicht von der Therapie profitieren, weil die wirksame Dosis (therapeutisches Fenster) durch übermäßigen Metabolismus nicht erreicht wird (orange); oder die Arzneistoffkonzentration (rot) aufgrund geringer Metabolisierung den wirksamen Bereich übersteigt und es somit zu einer Überdosierung bzw. Toxizitätserscheinungen kommt.

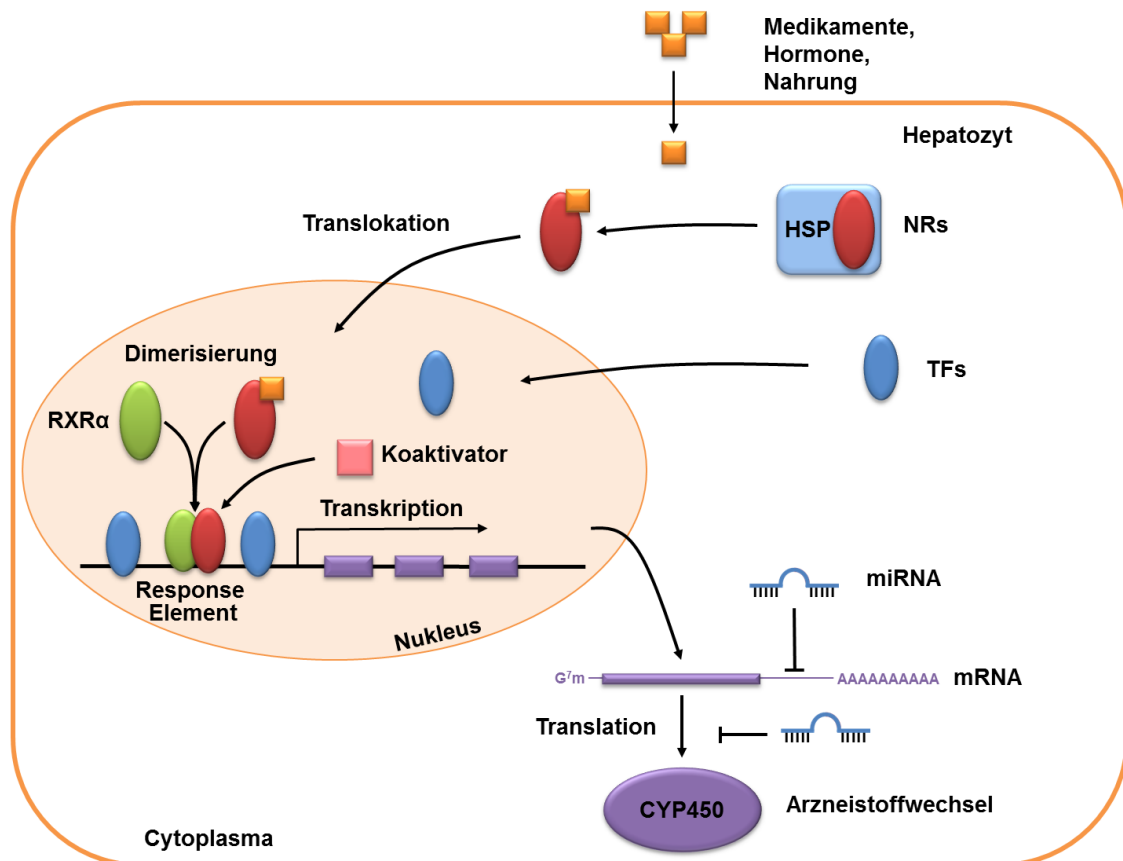
### 1.1.3 Regulation des Arzneistoffmetabolismus

Die am Arzneistoffmetabolismus beteiligten Enzymsysteme werden von einigen Transkriptionsfaktoren (TF), z. B. *hepatocyte nuclear factors* (HNFs) wie HNF-1 $\alpha$  und *CCAAT-enhancer binding proteins* (C/EBPs) reguliert (Gonzalez und Lee 1996). Hinzu kommen ligandenaktivierte Rezeptoren wie der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR), nukleäre Rezeptoren (NR) wie HNF-4 $\alpha$ , der Pregnan-X-Rezeptor (PXR) und der konstitutive Androstanrezeptor (CAR) sowie ihr Bindungspartner Retinoid-X-Rezeptor  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ) und Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) (Gerbai-Chaloin et al. 2013; Kandel et al. 2016; Oladimeji und Chen 2018).

Wie oben erläutert, spielen für die Regulation der CYP-Genexpression epigenetische, transkriptionelle und post-transkriptionelle Mechanismen eine Rolle. Für die basale Expression der CYPs sind leberspezifische TF verantwortlich, wobei ligandenabhängige NR die induzierbare CYP-Expression durch Medikamente regulieren (Honkakoski und Negishi 2000). TF wie die HNF-Familie mit HNF-1 $\alpha$  und C/EBPs sind an der leberspezifischen, konstitutiven Expression der CYPs beteiligt. Diese wirken über bestimmte Promotorsequenzen in den CYP-Genen, dabei können mehrere TF an einem Gen binden. HNF-4 $\alpha$  gehört zu den NR, bildet Homodimere und reguliert die Expression von CYP2C9 und CYP2D6 (Akiyama und Gonzalez 2003).

Viele endogene Substanzen als auch Xenobiotika wirken als Liganden von NR und induzieren ihren eigenen Metabolismus. NR spielen hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene eine Rolle in der Regulation von CYPs. Dabei bindet in den meisten Fällen der Ligand an den NR im Cytoplasma und aktiviert diesen. Dadurch kommt es zu einer Translokation des aktivierten NR in den Nukleus. Dort bildet der NR in der Regel ein Heterodimer mit RXR $\alpha$  und bindet durch die Interaktion mit Koaktivatoren wie dem Steroidrezeptor-Koaktivator-1 (SRC-1) und PPAR $\gamma$ -Koaktivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) an eine spezifische Sequenz in seinem Zielgen (Czekaj und Skowronek 2012; Oñate et al. 1995; Bhalla et al. 2004). Dadurch wird die jeweilige CYP-Expression induziert (Abb. 2). Im inaktivierten Zustand des NR können Korepressoren wie der *silencing mediator for retinoid or thyroid-hormone receptors* (SMRT) und *nuclear receptor co-repressor* (NCoR) binden (Privalsky 2004; Chen und Evans 1995; Hörlein et al. 1995). Diese Faktoren sind in der Lage, Histondeacetylasen (HDAC) zu rekrutieren, um durch Chromatinkondensation die Genexpression zu unterdrücken (Guenther et al. 2001).

## 1. Einleitung



**Abb. 2: Allgemeine Regulation des Arzneistoffmetabolismus.** Die basale CYP-Expression wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) reguliert, während die induzierbare Expression von CYPs durch nukleäre Rezeptoren (NR) gesteuert wird. NR wie CAR liegen als inaktiver Komplex mit Hitzeschockproteinen (HSP) im Cytoplasma vor. Durch die Ligandenbindung kommt es zu einer Ablösung der NR von den HSP und der Translokation des aktivierten NR in den Nucleus. Dort findet eine Dimerisierung mit RXR $\alpha$  statt und die Bindung des Komplexes an ein *DNA response element* innerhalb des Promotors. Der Komplex aus NR und RXR $\alpha$  rekrutiert Koaktivatoren, um die Expression des Zielgens anzuschalten. MiRNAs greifen als post-transkriptionelle Regulatoren ein, indem sie entweder an die mRNA binden und so die Translation inhibieren oder zu einer mRNA-Degradation führen. Nach Moore et al. (2006), Mangelsdorf und Evans (1995) und Bartel (2004).

Beim Arzneistoffmetabolismus sind hauptsächlich CAR und PXR für die Induktion verantwortlich; während der Farnesoid X Rezeptor (FXR), der Leber X Rezeptor (LXR) und der PPAR $\alpha$  am Gallensäure-, Cholesterin- bzw. Fettsäurestoffwechsel beteiligt sind. Als Bindungspartner vieler NR ist RXR $\alpha$  ein wichtiges Verbindungsglied zwischen verschiedenen Stoffwechselwegen (Czekaj und Skowronek 2012).

Die meisten NR bestehen aus drei Strukturelementen: der Aktivierungsdomäne, der DNA-Bindungsdomäne (DBD) und der Liganden-Bindungsdomäne (LBD) (Honkakoski und Negishi 2000; Moore et al. 2006). Ein typisches Medikament, das die CYP3A4 Expression über PXR induziert, ist das Antibiotikum Rifampicin (Akiyama und Gonzalez 2003). Die Behandlung mit Phenobarbital führt ligandenunabhängig zu einer Translokation von CAR und einer anschließenden Induktion der CYP2B-Familie.

Weitere Targets von CAR sind die CYP2C- und CYP3A-Familien (Tirona und Kim 2005). NR und TF stehen im gegenseitigen Austausch, was zu einem hochkomplexen Regulationsnetzwerk führt (Pavek 2016; Bosscher et al. 2006; Jover et al. 2009). Des Weiteren findet eine Regulation von NR durch post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung etc. statt. Diese Modifikationen können zur Aktivierung bzw. Deaktivierung von NR führen (Smutny et al. 2013; Becares et al. 2017).

Epigenetische Faktoren bilden eine weitere Regulationsebene der CYP-Expression. Dazu zählen DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und nicht-kodierende RNAs. Bisher können die Auswirkungen der DNA-Methylierung von ADME-Genen auf den Arzneistoffmetabolismus noch nicht genau abgeschätzt werden, da weitere Studien fehlen (Fisel et al. 2016). Kikuchi et al. (2006) konnten bereits zeigen, dass die Methylierung der Promotorregion des Transporters SLC22A8 zu einer Abnahme der Transkriptionsaktivität führte. Beim Transporter MDR1 konnte durch die Inhibierung der HDAC mittels FKK228 gezeigt werden, dass die Histonacetylierung im Promotor zu einer Zunahme der mRNA führte (Xiao et al. 2005).

Vor allem nicht-kodierende RNAs wie microRNAs (miRNAs) haben in den letzten Jahren eine größere Beachtung als Regulatoren der ADME-Gene erfahren. MiRNAs sind kurze, nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs, die ihre Targets hauptsächlich post-transkriptionell regulieren. Die Bindung von miRNAs im 3' untranslatierten Bereich (3'-UTR) von Transkripten führt zu einer mRNA-Degradation oder Unterdrückung der Translation (Abb. 2) (Nakano und Nakajima 2018). Eine der ersten Arbeiten zeigte eine Regulation von CYP1B1 durch miR-27b (Tsuchiya et al. 2006).

### **1.2 Entzündung**

Die Entzündungsreaktion ist ein komplexer Prozess im Körper, der vor allem durch das Eindringen von Pathogenen oder einer Gewebsverletzung ausgelöst wird. Sie spielt aber auch bei Verbrennungen, Traumata, Tumoren und Autoimmunerkrankungen eine Rolle (Medzhitov 2010; Renton 2004). Diese Reize führen zur Produktion und Ausschüttung von löslichen Faktoren wie Prostaglandinen, Proteasen, Faktoren des Komplementsystems, Stickstoffmonoxid (NO) und Polypeptiden wie Cytokinen. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von umliegenden Zellen wie Fibroblasten, Makrophagen und zur Rekrutierung von weiteren Immunzellen wie Leukozyten an den Ort des Geschehens, um die Pathogene zu bekämpfen (Feghali und Wright 1997). Die Funktion dieser akuten Entzündungsreaktion ist die Unterstützung der Gewebereparatur und Eingrenzung und Bekämpfung von eingedrungenen Pathogenen

(Medzhitov 2010). In der Initiierungsphase kommt es zum schnellen Umschalten auf die Synthese von proinflammatorischen Genen, während in der sich anschließenden Adaptionsphase diese Gene unterdrückt und antiinflammatorische Gene aktiviert werden. Die Wiederherstellung der Homöostase erfolgt in der Resolutionsphase, in der es zur Auflösung der Entzündung kommt. Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Adipositas, Atherosklerose und Diabetes findet keine Adaptions- oder Resolutionsphase statt, da es zu einer Aufrechterhaltung der proinflammatorischen Phase kommt (McCall et al. 2011).

Bei bakteriellen Infektionen führt das Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin, welches Bakterien auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, über Toll-like Rezeptoren (TLR) unter anderem zur Aktivierung von leberspezifischen Makrophagen, sogenannten Kupferzellen. Aktivierte Makrophagen produzieren proinflammatorische Cytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Diese induzieren wiederum die Produktion von IL-6 in Makrophagen, was weitere Reaktionen auslöst (Akira et al. 2006; Schwabe et al. 2006; Medzhitov 2010). Cytokine sind kleine Proteine mit pleiotropen Funktionen, die ein Molekulargewicht zwischen ca. 6-50 kDa und in der Regel eine sehr kurze Halbwertszeit haben (Feghali und Wright 1997; Gruys et al. 2005). Sie können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden: 1) Cytokine, die als positive und negative Wachstumsfaktoren auf Zellen wirken (IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)), 2) Cytokine, die proinflammatorisch wirken (IL-6, IL-1 $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha/\beta$ , Interferon- $\alpha/\gamma$  (IFN) und IL-8) und 3) Faktoren, die antiinflammatorisch wirken (IL-1 Rezeptorantagonisten, lösliche IL-1 Rezeptoren, TNF- $\alpha$ - und IL-1-bindende Proteine) (Gruys et al. 2005). IL-6 wird von vielen Zellen wie z. B. Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen produziert. IL-1 und TNF- $\alpha$  stimulieren außerdem die Produktion von IL-6 in Fibroblasten (Heinrich et al. 1990). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass auch Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Probanden höhere IL-6 und TNF- $\alpha$  Spiegel aufwiesen (Filella et al. 1996).

### 1.2.1 Akut-Phase-Reaktion

Die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen, vor allem von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , bewirkt eine systemische Reaktion, die sogenannte Akut-Phase-Reaktion (APR). Bei dieser kommt es zu Fieber, Erhöhung der Erythrozytensedimentationsrate, Leukozytose (Erhöhung der Leukozyten), Sekretion des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) und von Glukokortikoiden, Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems, Abnahme von Eisen und Zink im Serum und

Konzentrationsveränderungen bei Plasmaproteinen (Heinrich et al. 1990; Slaviero et al. 2003). Innerhalb weniger Stunden kommt es in der Leber zur Produktion und Sekretion von positiven Akut-Phase-Proteinen (APP) wie dem C-reaktive Protein (CRP), Serumamyloid A (SAA) und Haptoglobin (Hp) (Gruys et al. 2005). IL-6 ist dabei der Hauptregulator der APR in der Leber (Heinrich et al. 1990; Siewert et al. 2000). Die enorme Zunahme dieser positiven APPs (bis zu 1000-fach) ist mit einer starken Abnahme von negativen APPs wie Albumin verbunden. Positive APPs unterstützen die Erkennung von Pathogenen durch Opsonierung (Gruys et al. 2005). CRP hat eine längere Halbwertszeit als Cytokine und wird daher als systemischer Entzündungsmarker in der Klinik eingesetzt (Pepys und Hirschfield 2003).

Eine weitere Auswirkung der APR in der Leber ist die dramatische Herunterregulierung von ADME-Genen wie z. B. CYPs. Dies hat negative Konsequenzen auf den Arzneistoffmetabolismus von Medikamenten und kann zu Toxizitätserscheinungen führen (Gruys et al. 2005; Morgan 1997). Es gibt einige klinische Studien, in denen Patienten bei Infektionen und entzündlichen Erkrankungen eine verringerte Fähigkeit, mit Medikamenten umzugehen, nachgewiesen wurde. Die Patienten zeigten ein verändertes Ansprechen auf die Therapie und wiesen Vergiftungserscheinungen bei Medikamenten mit einer geringen therapeutischen Breite auf (Renton 2004). Einer der ersten Fälle eines veränderten Arzneimetabolismus wurde 1978 bei Kindern, die mit dem Antiasthmatikum Theophyllin behandelt wurden, bei einer Infektion mit Influenzaviren von Chang et al. (1978) beobachtet. Die Kinder litten aufgrund der Infektion und der geringen therapeutischen Breite unter Vergiftungserscheinungen von Theophyllin. Dieser Zusammenhang wurde durch andere Studien bestätigt und auch bei Kindern nach der Immunisierung gegen Influenza festgestellt (Kraemer et al. 1982; Renton et al. 1980; Gray et al. 1983). Patienten mit einem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) zeigten ebenso einen eingeschränkten Arzneistoffmetabolismus, welcher zu Arzneimittelnebenwirkungen bei diesen Patienten führen kann (Lee et al. 1993a). Carcillo et al. (2003) sahen auch bei Kindern mit Sepsis und erhöhten IL-6-Werten einen verminderten Arzneistoffmetabolismus von Antipyrin, einem Analgetikum. Da Antipyrin von mehreren CYPs metabolisiert wird, lässt sich daraus schließen, dass viele CYPs in Patienten mit Sepsis herunterreguliert sind (Aitken et al. 2006).

### **1.2.2 Mechanismen der Herunterregulierung von ADME-Genen**

Der Einfluss von entzündlichen Bedingungen auf den Arzneistoffmetabolismus und ihre Auswirkungen werden bereits seit einigen Jahren untersucht. Die Beteiligung von

verschiedenen Mechanismen an der Herunterregulierung von ADME-Genen wird diskutiert (Morgan 1997; Renton 2004, 2005; Aitken et al. 2006). Bisher wurde aber kein einzelner gemeinsamer Signalweg identifiziert, der alle entzündlichen Effekte auf CYPs erklären könnte (Renton 2005; Nguyen et al. 2015). Außerdem konnte noch nicht endgültig geklärt werden, ob es sich bei der Herunterregulierung der ADME-Gene durch eine Entzündung oder Infektion um einen Mechanismus zur Wiedererlangung der Homöostase oder einen pathologischen Effekt handelt (Morgan 1997). Eine weitere Vermutung ist, dass die Leber den Fremdstoffmetabolismus bei entzündlichen Bedingungen herunterfährt, um ihre Transkriptionsmaschinerie auf die Produktion von APPs umzuschalten, welche die Immunantwort unterstützen (Morgan 1989).

Die APR in der Leber wird vor allem durch IL-6 im Zusammenspiel mit IL-1, TNF- $\alpha$ , und Glukokortikoiden ausgelöst (Morgan 1997). Viele Studien zur Untersuchung der LPS- bzw. Cytokineffekte wurden in Rattenmodellen bzw. primären humanen Hepatozyten (PHH) durchgeführt (Morgan 2001). Diese Studien zeigten, dass verschiedene Cytokine unterschiedliche CYPs herunterregulieren und somit unterschiedliche Regulationswege beteiligt sein müssen (Morgan 2001). Die Regulation der ADME-Gene ist zudem vom jeweiligen Entzündungsmodell abhängig (Morgan et al. 2008).

Als ein Hauptmechanismus wird die Transkriptionsunterdrückung der ADME-Gene gesehen (Aitken et al. 2006; Morgan et al. 2008). Weitere Ansatzpunkte sind die mRNA, die Translation in das Protein sowie Proteindegradation und -modifikationen (Morgan 2001; Renton 2004). Durch die Herunterregulierung auf Transkriptionsebene kommt es zu einer Abnahme der mRNA vieler CYPs, welche in vielen Fällen mit einer Abnahme des jeweiligen Proteins und der Enzymaktivität korrespondiert (Renton 2004, 2005).

Cytokininduzierte TF wie der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B), aber auch leberspezifische TF wie C/EBPs, HNFs und NR spielen dabei eine Rolle (Tian et al. 1999; Alam et al. 1992; Aitken et al. 2006). Hierbei sollte aber zwischen den Faktoren der basalen und induzierbaren CYP-Expression unterschieden werden (Aitken et al. 2006).

C/EBPs und HNF-4 $\alpha$  sind in der basalen Expression der CYPs involviert (Akiyama und Gonzalez 2003). Für CYP3A4 wurde eine negative Regulation durch die IL-6 stimulierte Induktion von C/EBP $\beta$ -LIP beschrieben, wobei C/EBP $\beta$  eine Isoform ohne Transaktivierungsdomäne ist (Jover et al. 2002). Bei HNF-4 $\alpha$  war eine Proteinabnahme unter LPS-Behandlung bereits in Rattenlebern bestätigt worden. Allerdings war keine mRNA Abnahme sichtbar gewesen, daher wurde von einem post-transkriptionellen

Mechanismus ausgegangen. In HepG2-Zellen konnte gezeigt werden, dass die HNF-4 $\alpha$ -Proteinabnahme durch IL-1 $\beta$  durch eine beschleunigte Proteindegradation verursacht wurde, da die Proteinabnahme durch den Proteasominhibitor MG132 unterbunden werden konnte (Wang et al. 2001). Im Gegensatz dazu sahen Klein et al. (2015) in HepaRG-Zellen vor allem durch die Behandlung mit IL-1 $\beta$  bei HNF-4 $\alpha$  nach 24 h eine starke Abnahme auf mRNA-Ebene. Bei PHH hingegen war bereits nach 8 h ein negativer Effekt unter IL-6 zu sehen, der nach 24 h wieder verschwand (Klein et al. 2015). Somit scheint die Rolle von HNF-4 $\alpha$  von der Behandlung und des verwendeten Modells abhängig zu sein.

NF- $\kappa$ B wird durch inflammatorische Stimuli wie LPS und Cytokine induziert (Ghosh et al. 1998; Gu et al. 2006; Abualsunun und Piquette-Miller 2017). Unter TNF- $\alpha$ -Einfluss sahen Tian et al. (1999) eine Interaktion zwischen NF- $\kappa$ B und AhR, was die Expression von CYP1A1 und CYP1A2 beeinflusste. Des Weiteren konnte in Rattenhepatozyten gezeigt werden, dass cytokininduziertes NF- $\kappa$ B an den Promotor von CYP2C11, welches ein Ortholog des humanen CYP2C9 ist, bindet. Die Störung dieser Bindung verhinderte die Unterdrückung der CYP2C11-Expression durch Cytokine (Iber et al. 2000). Zahlreiche Studien zeigten durch die entzündungsbedingte Aktivierung von NF- $\kappa$ B eine Expressionabnahme von NR wie PXR und CAR (Beigneux et al. 2002; Teng und Piquette-Miller 2005; Abualsunun und Piquette-Miller 2017). Zusammenfassend werden drei unterschiedliche Regulationswege von CYPs durch NF- $\kappa$ B angenommen: 1. Eine direkte Regulation durch Bindung an den jeweiligen Promotor, 2. eine indirekte Regulation über NR wie AhR, CAR und PXR etc., 3. eine Regulation durch Induktion der Hämoxxygenase oder Auswirkungen auf die Proteinstabilität (Zordoky und El-Kadi 2009).

An der induzierbaren Expression der CYPs sind vor allem CAR, PXR und RXR $\alpha$  beteiligt. Pascussi et al. (2000) sahen unter IL-6-Behandlung eine Abnahme von PXR- und CAR-mRNAs in PHH, was auch in anderen Arbeiten durch IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Behandlung bestätigt und erweitert wurde (Klein et al. 2015; Tanner et al. 2018).

In PXR Wildtyp (+/+) Mäusen kam es zu einer Herunterregulierung von ADME-Genen wie *multidrug resistance-associated protein 2 (mrp2)*, *bile salt export pump (bsep)* und *cyp3a11* durch IL-6-Behandlung, während es in PXR-Knockout (KO) (-/-) Mäusen zu keiner Abnahme kam (Teng und Piquette-Miller 2005). Richardson und Morgan (2005) sahen hingegen in PXR (-/-) Mäusen eine Abnahme von *cyp3a11* nach LPS-Behandlung. Andererseits konnte Yang et al. (2010) zeigen, dass PXR essenziell bei der IL-6-induzierten Herunterregulierung der CYPs in PHH ist. Eventuell übernehmen



bei einer LPS-Stimulation andere Cytokine wie IL-1 $\beta$  die Suppression der ADME-Gene und wirken nicht wie IL-6 über PXR, sondern über NF- $\kappa$ B (Abualsunun und Piquette-Miller 2017). Andere NR könnten zudem die Wirkung von PXR kompensieren (Gu et al. 2006; Shah et al. 2014). Gu et al. (2006) stellten fest, dass NF- $\kappa$ B mit der DNA-Bindungsdomäne von RXR $\alpha$  interagiert und somit die Transaktivität von PXR und RXR $\alpha$  hemmt. Ning et al. (2017) diskutierten eine Involvierung des *differentiated embryo-chondrocyte expressed gene 1* (DEC1), einem Transkriptionsfaktor, in der IL-6-induzierten Herunterregulierung von ADME-Genen. Sie konnten eine Induktion von DEC1 durch IL-6 in Hepatozyten zeigen. Die Überexpression von DEC1 führte zu ähnlichen Effekten auf ADME-Gene wie IL-6, während das Ausschalten (Knockdown (KD)) zu keiner Abnahme führte. Außerdem konnten sie eine Interaktion zwischen RXR $\alpha$  und DEC1 nachweisen (Ning et al. 2017). Hinzu kommt, dass PXR unter inflammatorischen Bedingungen post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierung, SUMOylierung und Ubiquitinierung aufweisen kann und dadurch seine Funktion verliert (Hu et al. 2010; Smutny et al. 2013; Cui et al. 2015). Die Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC) sind durch inflammatorische Stimuli wie Cytokine induzierbar und können PXR und seine Koaktivatoren phosphorylieren und somit inaktivieren (Ding und Staudinger 2005; Lichti-Kaiser et al. 2009).

Einige Studien zeigten zudem, dass auch CAR als ein weiterer wichtiger NR in der induzierbaren Expression der CYPs bei Entzündung negativ reguliert wird (Pascussi et al. 2000; van Ess et al. 2002). Van Ess et al. (2002) erkannten, dass der TNF- $\alpha$ -Signalweg zu einer verminderten Induktion von CYP2B und CYP3A durch Phenobarbital, einem CAR-Induktor, in Mäusen führte. Auch in PHH war unter IL-1 $\beta$  und LPS-Einfluss eine Abnahme der CAR-Expression sowie verminderte Induktion von CAR-abhängigen CYPs zu sehen gewesen (Assenat et al. 2004). Assenat et al. (2004) nahmen an, dass dies durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B geschah, welches mit dem CAR-Promotor interagiert. Ein weiterer Mechanismus ist die IL-6-bedingte Aktivierung der ERK1/2, die über den Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweg stattfindet (Eulenfeld et al. 2012). Diese Kinasen können CAR im Cytoplasma phosphorylieren, was seine Translokation in den Nukleus verhindert (Koike et al. 2007). Sidhu und Omiecinski (1995) konnten auch eine verminderte Induktion von CAR-abhängigen Genen durch die Aktivierung von PKA in Rattenhepatozyten feststellen. Analog zu PXR war auch bei LPS behandelten CAR-KO-Mäusen und CAR-humanisierten Mäusen keine Abschwächung der Herunterregulierung der ADME-Gene zu sehen gewesen. Somit ist von einer CAR-unabhängigen Regulation auszugehen (Shah et al. 2014). Untersuchungen von PXR/CAR-Doppel-KO-Mäusen könnten hier die endgültigen Rollen klären (Shah et al. 2014).

## 1. Einleitung

---

Ein systembiologisches Modell, basierend auf Datensätzen von IL-6-behandelten PHH, postulierte eine bedeutende Rolle von NR im Duplex mit RXR $\alpha$  bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung (Keller et al. 2016). Ferner konnte in PHH durch einen Knockdown von RXR $\alpha$  diese Rolle bestätigt werden, da sich dieser ähnlich wie die IL-6-Behandlung negativ auf die ADME-Genexpression auswirkte (Keller et al. 2016). Beigneux et al. (2000) vermuteten, dass RXR $\alpha$  nach LPS-Behandlung durch beschleunigte mRNA-Degradation in Hamstern abnahm. Auch in Mäusen konnten diese Beobachtungen gemacht werden (Beigneux et al. 2002). Klein et al. (2015) sahen hingegen in PHH und HepaRG-Zellen unter IL-1 $\beta$ -Behandlung nur geringe Abnahmen der RXR $\alpha$ -mRNA, während IL-6- und TNF- $\alpha$ -Behandlungen keine Auswirkungen hatten. Studien in Mäusen und HepG2-Zellen zeigten unter LPS- bzw. IL-1 $\beta$ -Einfluss eine post-translationale Modifikation (Phosphorylierung durch JNK) und den nukleären Export von RXR $\alpha$ . Dadurch kam es zu einem Funktionsverlust und Degradation von RXR $\alpha$  im Cytoplasma (Ghose et al. 2004; Zimmerman et al. 2006). Des Weiteren konnten sie zeigen, dass Rosiglitazon, ein PPAR $\gamma$ -Agonist mit antiinflammatorischen Eigenschaften, den nukleären Export von RXR $\alpha$  bei entzündlichen Bedingungen verhinderte (Ghose et al. 2007). Andere Studien zeigten, dass RXR $\alpha$  durch Phosphorylierung seine Fähigkeit, Heterodimere zu bilden, verliert bzw. Koaktivatoren nicht mehr rekrutiert werden (Yoshimura et al. 2007; Macoritto et al. 2008). Schneider Aguirre und Karpén (2013) sahen unter LPS-, IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ -Behandlung eine weitere post-translationale Modifikation (SUMOylierung) von RXR $\alpha$  in Huh7-Zellen, was auch zu der Abnahme von RXR $\alpha$  regulierten Genen bei Entzündung beitragen könnte. Dennoch ist die genaue Rolle von RXR $\alpha$  noch nicht ausreichend geklärt.

Ein weiterer Bindungspartner von RXR $\alpha$  ist PPAR $\alpha$ , ein wichtiger Regulator im Fettstoffwechsel (Beigneux et al. 2000). Studien mit PPAR $\alpha$ -KO-Mausmodellen zeigten, dass die Abnahme von CYP2A5, CYP2C29 und CYP3A11 unter LPS-Behandlung PPAR $\alpha$ -abhängig war und PPAR $\alpha$  somit eine Rolle bei der Herunterregulierung von bestimmten CYPs spielen kann (Barclay et al. 1999). In Hamstern kam es unter LPS-Behandlung zu einer Abnahme der PPAR $\alpha$  mRNA (Beigneux et al. 2000). Andererseits postulierten Richardson und Morgan (2005), dass die Herunterregulierung der CYPs nicht von PPAR $\alpha$  abhängig sei, da sie durch bessere methodische Techniken wie quantitative real-time PCR (qRT-PCR) nun keine Unterschiede im Verhalten von PPAR $\alpha$  (+/+) und (-/-) Mäusen bei LPS-Behandlung sahen. Kim et al. (2007) beobachteten durch die Behandlung mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach 24 h eine Abnahme von RXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXRA und den Koaktivatoren SRC-1 und PGC-1 $\alpha/\beta$  in Hep3B Zellen. Sie nahmen an, dass auch die Regulation von

Koaktivatoren einen negativen Einfluss auf die CYP-Expression haben könnte (Kim et al. 2007).

Ein gänzlich anderer Signalweg wird durch NO aktiviert. Bei einer Entzündung kommt es zu der Produktion von NO durch die induzierbare NO-Synthase NOS2 (Renton 2004). Einige Studien, die sich mit der Rolle von NO in der Regulation von ADME-Genen beschäftigt hatten, zeigten hier jedoch widersprüchliche Ergebnisse (Khatsenko et al. 1993; Sewer und Morgan 1997). Eine Annahme ist, dass die LPS-Konzentration entscheidend für die NO-abhängige Abnahme der CYPs ist. Hohe LPS-Konzentrationen führten zu einer schnellen und NO-abhängigen Abnahme der CYPs, während es bei niedrigen LPS-Konzentrationen zu einer langsameren NO-unabhängigen Regulation der CYPs über CAR kam (Morgan et al. 2002). NO scheint vor allem für CYP2B6 bei entzündlichen Bedingungen eine Rolle als post-transkriptionaler Regulator zu spielen. Aitken et al. (2008) konnten durch die Behandlung mit einem NO-Donoren eine Abnahme des CYP2B6-Proteins in PHH zeigen, während die mRNA kaum Veränderungen aufwies. Die Zugabe von NO-Inhibitoren schwächte zudem die erwartete Proteinabnahme durch Cytokine ab. Allerdings konnte dieses Verhalten für CYP2E1 und CYP3A4 nicht bestätigt werden (Aitken et al. 2008).

Eine Folge der Entzündungsreaktion ist die Entstehung von oxidativem Stress, bei dem es zu einer Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt. CYP1A1 und CYP1A2 zeigten ein Ansprechen auf oxidativen Stress in Ratten (Barker et al. 1994). In Mäusen wiesen CYP3A und PXR eine zum Teil ROS-abhängige Regulation auf (Xu et al. 2004). Die Zugabe von Antioxidantien konnte zudem die Abnahme von CYPs bei septischen Ratten verhindern (Kim und Lee 2006). Trotz alledem spielen ROS nur in einigen wenigen Fälle eine Rolle bei der Regulation (Renton 2004).

Die Blockierung der Transkription kann aber nicht allein für den starken und schnellen Verlust der CYP-mRNAs durch inflammatorische Stimuli verantwortlich sein (Morgan 1989; Renton 2004). Auch post-transkriptionelle Faktoren wie miRNAs oder die mRNA-Degradation könnten bei entzündlichen Bedingungen eine Rolle in der ADME-Genregulation spielen. Bei der Entstehung des hepatozellulären Karzinoms kommt es zur Herunterregulierung von HNF-4 $\alpha$ . Hatziapostolou et al. (2011) nahmen an, dass die Abnahme von HNF-4 $\alpha$  durch einen entzündungsassoziierten Rückkopplungsmechanismus unter der Beteiligung von miR-124, IL6R, STAT3, miR-24, und miR-629 verursacht wurde. Des Weiteren spielt die entzündungsassoziierte miR-130b in der Regulation von CYP2C9 eine Rolle (Rieger et al. 2015). Weitere

Forscher, die eine Abnahme der CYP1A1, CYP1A2 bzw. RXR $\alpha$ -mRNA durch Interferon bzw. LPS-Behandlung feststellten, gingen von einer post-transkriptionellen Degradation der mRNA aus (Delaporte und Renton 1997; Beigneux et al. 2000).

Zahlreiche Studien wurden mit verschiedenen Modellen und unterschiedlichen inflammatorischen Stimuli wie LPS und Cytokinen durchgeführt. Diese Studien zeigten Speziesunterschiede und eine Abhängigkeit der Immunantwort vom jeweiligen Cytokin (Pondugula et al. 2009; Seok et al. 2013). Oft wurden zudem nur Effekte von einzelnen Cytokinen betrachtet, wobei es bei einer Entzündung zur Ausschüttung von mehreren Cytokinen kommt. Allerdings ist nicht ausreichend geklärt, inwiefern die bereits erwähnten Mechanismen an der dramatischen Herunterregulierung der ADME-Gene bei Entzündung beteiligt sind und ob nicht weitere, bisher unbeachtete Mechanismen in Frage kommen.

### 1.3 MicroRNAs

#### 1.3.1 Biogenese und Wirkung von microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, einzelsträngige, nicht-kodierende RNAs mit einer Länge von ca. 22 Nukleotiden (nt) (Bartel 2004). Lee et al. entdeckten 1993 im Fadenwurm *C. elegans*, dass das Gen *lin-4* nicht für ein Protein kodierte, sondern für eine kleine RNA, die das Gen *lin-14* negativ beeinflusste. Später konnte gezeigt werden, dass kleine RNAs wie *let-7* in Tieren hoch konserviert sind und auch bei Menschen eine Rolle spielen (Reinhart et al. 2000; Pasquinelli et al. 2000; Ibáñez-Ventoso et al. 2008; Lee et al. 2016). Wegen ihrer kleinen Größe wurden sie schließlich miRNAs genannt (Lagos-Quintana et al. 2001). Aufgrund ihrer Wirkung auf mRNAs spielen sie vor allem in der post-transkriptionellen Genregulation eine Rolle (Wightman et al. 1993).

MiRNAs werden von miRNA-Genen kodiert, die im gesamten Genom verteilt sind (Lagos-Quintana et al. 2001; Rodriguez et al. 2004). Diese können in einem Exon bzw. Intron eines proteinkodierenden Genes oder zwischen einzelnen Genen liegen und werden in einigen Fällen parallel zum umliegenden Gen abgelesen (Rodriguez et al. 2004; Hinske et al. 2010). MiRNA Gene befinden sich zu 52 % hauptsächlich zwischen Genen, während 43 % intronisch und nur 5 % exonisch liegen (Hinske et al. 2010). Des Weiteren gibt es sogenannte Mirtrons, die sich als Intron direkt zwischen zwei Exons befinden und durch Spleißen eine andere Reifung durchlaufen als normale miRNA Gene (Berezikov et al. 2007; Ruby et al. 2007; Olena und Patton 2010). Über Sequenzhomologie werden miRNAs in Familien eingeteilt, deren Mitglieder eine

identische bzw. sehr ähnliche „Seed“-Sequenz besitzen (Olena und Patton 2010; Berezikov 2011). Unter einer Seed-Sequenz versteht man eine 2-7 lange Nukleotidabfolge am 5' Ende der miRNA, die essenziell für die Basenpaarung zwischen miRNA und der Target-mRNA ist (Olena und Patton 2010). Zusätzlich zu ihrer genomischen Lage können miRNAs auch in einem Cluster vorliegen, sodass mehrere miRNAs hintereinander liegen und polycistronisch abgelesen werden (Olena und Patton 2010; Song und Wang 2008). Die Benennung der miRNAs erfolgte fortlaufend nach ihrer Entdeckung, dabei wird das Präfix „miR“ für reife miRNAs sowie eine einmalige Nummer verwendet (Ambros et al. 2003). Identische miRNA-Sequenzen, die aber aus unterschiedlichen genomischen Loci entstanden sind, haben den gleichen Namen und werden durch Nummernsuffixe unterschieden (mir-125b-1 und mir-125b-2). Unterscheiden sich die Sequenzen hingegen nur in 1-2 Basen, werden diese mit Buchstabensuffixen gekennzeichnet (miR-181a und miR-181b). Die beiden Stränge der unreifen miRNA werden aufgrund ihrer Lage (5'-Arm oder 3'-Arm) benannt: miR-142-5p und miR-142-3p. In der Regel gibt es einen vorherrschenden Strang (*guide* Strang), der biologisch aktiver ist als der *passenger* Strang, der auch oft miRNA\* genannt wird (Griffiths-Jones 2004; Ha und Kim 2014).

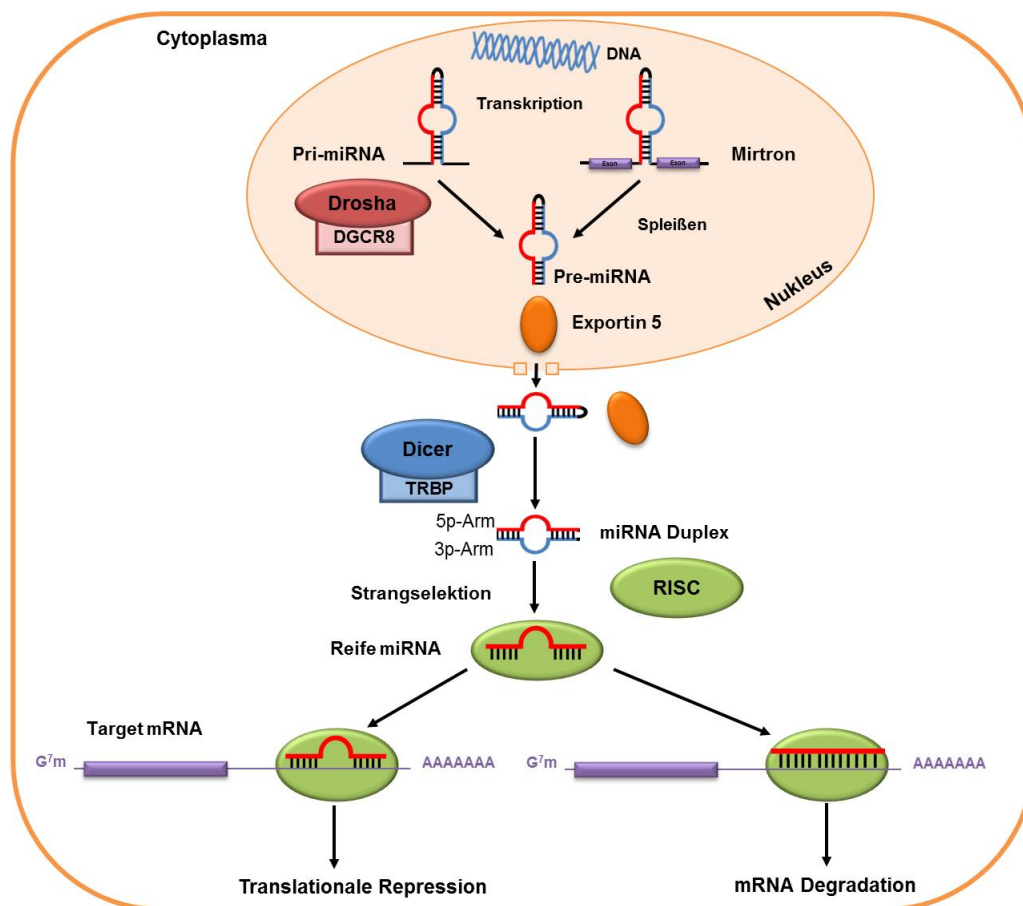
Die klassische Biogenese von miRNAs besteht aus der Transkription des miRNA-Gens, der Prozessierung durch die RNase III Drosha, dem Transport durch Exportin 5 aus dem Nukleus, einer weiteren Prozessierung durch den Dicer, der Aufnahme in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) und der Bindung an die Ziel-mRNA (Ha und Kim 2014) (Abb. 3). Bei der nicht-klassischen Biogenese werden Mirtrongene nach der Transkription nicht durch Drosha, sondern durch das Spleißosom prozessiert; alle weiteren Schritte finden aber analog zur klassischen Biogenese statt (Berezikov et al. 2007; Ruby et al. 2007). Die Transkription der miRNAs wird in der Regel von der RNA Polymerase II durchgeführt (Cai et al. 2004; Lee et al. 2004). Die dabei entstehende *primary* miRNA (pri-miRNA) besitzt eine Haarnadelstruktur und kann bis zu einige Tausend Nukleotide lang sein (Davis-Dusenbery und Hata 2010). Drosha und das RNA-Bindeprotein *DiGeorge Syndrome Critical Region 8* (DGCR8) formen einen Komplex, der Mikroprozessor genannt wird. Der Mikroprozessor spaltet die pri-miRNA, sodass die *precursor* miRNA (pre-miRNA) entsteht (Länge: 60-90 nt) (Lee et al. 2003; Denli et al. 2004; Borchert et al. 2006; Gregory et al. 2004; Krol et al. 2004). Diese gelangt mithilfe von Exportin 5, einem RanGTP-abhängigen Protein, durch die Kernpore in das Cytoplasma (Yi et al. 2003; Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004). Dort wird es durch den Dicer im Verbund mit dem *human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein* (TRBP) durch die Entfernung der

terminalen Schlaufe zu einem miRNA-Duplex gespalten (Carmell und Hannon 2004; Zhang et al. 2004; Chendrimada et al. 2005). Der miRNA-Duplex wird durch die Bindung an das Argonautprotein (AGO) in den RISC geladen (Winter und Diederichs 2011; Gregory et al. 2005; Diederichs und Haber 2007). Dort trennt sich der *passenger* vom *guide* Strang ab und verlässt den RISC (Chiang et al. 2010; Khvorova et al. 2003; Ro et al. 2007). Der miRISC bindet dann durch Basenpaarung in der 3'-UTR an seine Ziel-mRNA. MiRNA-Bindestellen befinden sich hauptsächlich in der 3'-UTR. Seltener treten Bindestellen in der 5'-UTR, der kodierenden Sequenz und Promotoreregionen auf (Xu et al. 2014). Die Bindungsregion zwischen mRNA und miRNA, in der ebenfalls die Seed-Sequenz liegt, wird auch *miRNA response element* (MRE) genannt (O'Brien et al. 2018). Abhängig von der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA kommt es zur translationalen Repression oder mRNA-Degradation (Hoffmann et al. 2012). Bei einer vollständigen Komplementarität wird die mRNA durch den miRISC gespalten und schließlich degradiert (Bartel 2004). Bei unvollständiger Komplementarität wird das Protein GW182 und weitere Effektorproteine durch den miRISC rekrutiert und markieren die mRNA für den Abbau. Dadurch kommt es zur Deadenylierung der mRNA und Entfernung der Kappe. Darauf folgend wird die Ziel-mRNA bis zur mRNA-Degradation in sogenannten *processing bodies* (P-bodies) im Cytoplasma gespeichert. Weitere Mechanismen sind die Inhibierung der Translationsinitiation (Unterbindung der Kappenerkennung) und -elongation (z. B. Abfall der Ribosomen von der mRNA) (Rehwinkel et al. 2005; Behm-Ansmant et al. 2006; Filipowicz et al. 2008). So kommt es nicht zwangsläufig zu einer Abnahme der mRNA. In den meisten Fällen führen miRNAs zu einer mRNA-Destabilisierung (Eichhorn et al. 2014; Guo et al. 2010). MiRNAs können sich aber auch positiv auf die Genexpression auswirken, in dem sie die Translation hochregulieren (Vasudevan et al. 2007). Neue Erkenntnisse zeigen, dass mRNAs durch MREs im gegenseitigen Austausch in sogenannten Schwämmen stehen und zu komplexen Netzwerken beitragen (Salmena et al. 2011; Thomson und Dinger 2016).

Mittlerweile sind laut der miRNA-Datenbank miRBase 2 654 miRNAs im Menschen bekannt (Kozomara et al. 2019). Die miRNA-Expression ist vom jeweiligen Gewebe abhängig, so ist z. B. die Expression von miR-122 leberspezifisch (Lagos-Quintana et al. 2002). MiRNAs sind an den verschiedensten Prozessen wie Entwicklung, Proliferation, Apoptose und Metabolismus beteiligt (Kloosterman und Plasterk 2006). Die Deregulierung von miRNAs kann zu vielen Krankheitszuständen wie Krebs beitragen (Tüfekci et al. 2014; Deiuliis 2016; Paul et al. 2018). Es ist davon auszugehen, dass über 50 % der proteinkodierenden mRNAs von miRNAs reguliert werden können (Lewis et al. 2005; Chekulaeva und Filipowicz 2009; Krol et al. 2010).

# 1. Einleitung

MiRNAs können auch z. B. ins Blut sekretiert werden und hormonähnliche Wirkungen auf andere Zellen haben (Wang et al. 2009; Roderburg et al. 2015; Iftikhar und Carney 2016; O'Brien et al. 2018). Durch die Zirkulation im Blut eignen sich miRNAs auch als Biomarker z. B. für Lungenkrebs, kolorektales Karzinom, Diabetes und Lebererkrankungen (Chen et al. 2008; Hayes und Chayama 2016). Der miR-122-Inhibitor Miravirsin wurde zur Behandlung von Hepatitis C entwickelt. Miravirsin unterbindet die Funktion der miR-122, welche die virale RNA normalerweise vor dem Abbau schützt, sodass das Virus zerstört werden kann (Jopling et al. 2005). Ein weiteres Beispiel ist Cobomarsin, ein miR-155-Inhibitor, der das Wachstum des kutanen T-Zelllymphom reduziert (Seto et al. 2018).



**Abb. 3: MiRNA-Biogenese und Funktion.** MiRNAs werden als polyadenylierte primäre Transkripte (pri-miRNAs) transkribiert. Die enthaltene Haarnadelstruktur wird von der Endonuklease Drosha herausgeschnitten und als pre-miRNA durch Exportin 5 in das Cytoplasma transportiert. Danach wird sie von einer weiteren Endonuklease Dicer prozessiert, sodass ein miRNA-Duplex entsteht. Dieser wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen und der Gegenstrang (blau) dissoziiert vom *guide* Strang (die reife miRNA). Der miRISC bindet in der Regel in der 3'-UTR der Ziel-mRNA und führt bei unvollständiger Komplementarität zwischen miRNA und mRNA zu einer translationalen Repression bzw. bei vollständiger Komplementarität zu einer mRNA-Degradation. Die Biogenese von Mirtrons verläuft analog, außer dass die Prozessierung der pri-miRNA durch das Spleisosom erfolgt und nicht durch Drosha (Modifiziert nach Filipowicz et al. (2008), Hoffmann et al. (2012), Davis-Dusenbery und Hata (2010) und Ha und Kim (2014)).

MiRNAs spielen auch in der Regulation des Immunsystems eine Rolle (O'Neill et al. 2011; McCall et al. 2011). Unter anderem sind sie an der Entwicklung und Reifung von Immunzellen beteiligt und regulieren akute und chronische Immunantworten (Baltimore et al. 2008; O'Neill et al. 2011; O'Connell 2012). Daher können sie auch an der Entwicklung von chronisch-entzündlichen Krankheiten wie Diabetes mellitus, Adipositas und Asthma beteiligt sein (Marques-Rocha et al. 2015). Des Weiteren wird eine Beteiligung von miRNAs bei der Entwicklung von Lebererkrankungen wie Cholestase, Steatose und nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH) diskutiert (Marin et al. 2014; Pisarello et al. 2015; Wang et al. 2015). MiRNAs können durch LPS oder Cytokine in Makrophagen induziert werden und in Mikrovesikeln (Exosomen) verpackt zu anderen Zellen wie z. B. Endothelzellen oder Fibroblasten transportiert werden und dort wirken (Taganov et al. 2006; Roy 2016; Ismail et al. 2013). Tili et al. (2007) sahen durch LPS in Mausmakrophagen eine Hochregulierung von miR-155, einem Hauptregulator bei Entzündungen (Mahesh und Biswas 2019). Sie nahmen an, dass miR-155 unter transkriptioneller Kontrolle von NF- $\kappa$ B steht und eine Rolle bei der Regulation der LPS-induzierten Immunantwort spielt (Tili et al. 2007). Rieger et al. (2013) konnten miR-130b mit Entzündung in Lebern von Patienten mit erhöhtem CRP assoziieren. Außerdem zeigten sie eine negative Regulation von CYP2C9 durch miR-130b und somit zum ersten Mal die Beteiligung einer entzündungsassoziierten miRNA an der Herunterregulierung von ADME-Genen (Rieger et al. 2015).

Für die Untersuchung von miRNA-Effekten ist die Vorhersage von potenziellen miRNA-Targets ein wichtiges Vorgehen. Allerdings ist dies eine komplexe Aufgabe, da miRNAs nur über eine sehr kurze Sequenz, der Seed-Sequenz, an mRNAs binden (Nakajima und Yokoi 2011). In den letzten Jahren haben sich dabei mehrere Kriterien und Vorhersagedatenbanken wie TargetScan (Friedman et al. 2009; Agarwal et al. 2015), miRanda (Betel et al. 2008; Betel et al. 2010), miRDB (Liu und Wang 2019) und mirDIP (Tokar et al. 2017) entwickelt und etabliert. Die Anzahl an vorhergesagten Targets variiert aber je nach Algorithmus, da verschiedene Kriterien wie die Gewichtung der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA, die Konservierung der Bindestelle, die freie Energie des miRNA-mRNA-Duplexes und die Zugänglichkeit der Bindestelle berücksichtigt werden (Nakajima und Yokoi 2011). Durch die Sequenzähnlichkeiten innerhalb des Genoms kann eine einzelne miRNA bis zu 100 verschiedene mRNAs innerhalb einer Zelle regulieren (Betel et al. 2008; Dluzen und Lazarus 2015).



### **1.3.2 MicroRNAs als negative Regulatoren von ADME-Genen**

Die Regulation von ADME-Genen durch miRNAs wird seit einigen Jahren untersucht (Takagi et al. 2008; Mohri et al. 2010; Kida et al. 2011; Haenisch et al. 2011; Oda et al. 2014). Eines der ersten Beispiele war die negative Regulation von CYP1B1 durch miR-27b. CYP1B1 spielt eine Rolle beim Mammakarzinom (Tsuchiya et al. 2006). Die gleiche Gruppe konnte ein paar Jahre später zeigen, dass auch PXR als wichtiger Regulator in der induzierbaren Expression von CYPs durch miRNAs reguliert wird. Dies wirkte sich negativ auf die Expression von CYP3A4 in der Leber aus (Takagi et al. 2008). Nicht nur CYPs und NR unterliegen der Regulation durch miRNAs, sondern auch Phase II-Enzyme wie UGTs und Transporter wie das MDR1/P-Glykoprotein (Papageorgiou und Court 2017; Zhu et al. 2008). Die unterschiedliche Expression von miRNAs kann zu einer Variabilität im Arzneistoffmetabolismus führen (Bolley et al. 2015).

Innerhalb der miRNA-Regulation kann es zu einer weiteren Variabilität durch SNPs kommen. Dabei können Gene, die in der miRNA-Biogenese involviert sind, pre-miRNAs und reife miRNAs wie auch ihre Bindestellen in mRNAs betroffen sein. MiRNA-Bindestellen können neu entstehen bzw. zerstört werden und somit einen Einfluss auf die Regulation des Arzneistoffmetabolismus haben (Zanger et al. 2018). Datenbanken wie Patrocles (Hiard et al. 2010) und PolymiRTS (Bhattacharya et al. 2014) unterstützen bei der Vorhersage von potenziellen neuen bzw. zerstörten miRNA-Bindestellen in mRNAs. Beispielsweise verhinderte ein SNP in der 3'-UTR von CYP2E1 die Bindung von miR-570, die normalerweise an der Regulation von CYP2E1 beteiligt ist (Nakano et al. 2015).

### **1.4 Hepatische Zellmodelle**

Viele mechanistische Studien, die sich mit der Akut-Phase-Reaktion in der Leber befasst haben, wurden in Maus- bzw. Rattenmodellen durchgeführt (Aitken et al. 2006). Allerdings weisen diese Modelle Unterschiede zum Menschen hinsichtlich ihres Verhaltens bei entzündlichen Bedingungen auf genomischer Ebene auf, die auch ADME-Gene betreffen (Seok et al. 2013). Daher sind Untersuchungen in anderen humanen hepatischen Zellmodellen unerlässlich.

### 1.4.1 Primäre Hepatozyten

Für die Untersuchung des Metabolismus von endo- und exogenen Substanzen in der Leber gelten PHH bis heute als der Goldstandard (LeCluyse et al. 2005; LeCluyse und Alexandre 2010; Klein et al. 2015). Die Leber besteht zu 80 % aus Hepatozyten und zu 20 % aus nicht-parenchymalen Zellen wie hepatischen Sternzellen, Endothelzellen, Kupffer-Zellen und weiteren Immunzellen (Godoy et al. 2013). Die Gewinnung von PHH erfolgt aus Lebergewebe, das bei Leberresektionen zur Entfernung von Lebertumoren oder aus Multiorganspendern entnommen wurde (LeCluyse et al. 2005). Die Isolierung von Hepatozyten erfolgt in der Regel durch eine 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik (Vondran et al. 2008). Diese Prozedur sollte nur von erfahrenem Personal in speziellen Zentren durchgeführt werden, um eine optimale Ausbeute und hohe Zellviabilität zu erhalten (Pless et al. 2012). PHH können entweder sofort nach der Isolierung verwendet oder kryokonserviert werden, was eine langfristige Lagerung ermöglicht (Pless et al. 2012; Godoy et al. 2013). Jedoch kann die Kryokonservierung zu Zellverlust und reduzierter Adhärenz der Zellen beim Ausplattieren führen (Pless et al. 2012). Es gibt verschiedene Kultivierungsformate für PHH: 2D (LeCluyse 2001) und 3D (Spheroide) (Bachmann et al. 2015) sowie die Ko-Kultur z. B. mit Kupffer-Zellen (Nguyen et al. 2015). Allerdings weisen PHH eine begrenzte Kultivierungsdauer auf (ein bis zwei Wochen). Nach dem Ausplattieren kommt es zu einer schnellen Dedifferenzierung mit Verlust von leberspezifischen Eigenschaften wie der CYP-Aktivität (LeCluyse 2001; Godoy et al. 2013). Des Weiteren weisen PHH eine hohe Variabilität abhängig vom jeweiligen Donoren auf. Die Donoren können sich durch Geschlecht, Alter, verschiedene Krankheiten, Grund der Leberresektion und Medikamenteneinnahme unterscheiden. Dies kann z. B. Auswirkungen auf die Stärke der CYP-Aktivitäten und die Reproduzierbarkeit von Experimenten haben (Guguen-Guillouzo und Guillouzo 2010). Ein Vorteil von kryokonservierten humanen Hepatozyten (KHH) im Vergleich zu frischen PHH ist die bessere Planbarkeit und Reproduzierbarkeit von Experimenten durch die Verfügbarkeit von mehreren kryokonservierten Aliquots eines Donors. Seit einigen Jahren kann die Variabilität zwischen verschiedenen Donoren durch die Generierung von Aliquots gepoolter Donoren ausgeglichen werden (Roymans et al. 2004; Li 2015; Yokoyama et al. 2018). PHH weisen eine schlechte Transfizierbarkeit von Plasmiden auf. Dennoch ist ein viraler Gentransfer möglich (Zamule et al. 2008; Thomas et al. 2014). Einige Studien konnten zeigen, dass PHH auf Cytokine ansprechen und diese eine APR in PHH auslösen (Klein et al. 2015; Keller et al. 2016). Jedoch ist die Verfügbarkeit von PHH kaum vorherzusagen und weiterhin sehr beschränkt (Pless et al. 2012).

### 1.4.2 Hepatische Zelllinien

In der Forschung werden vor allem die HepG2- und Huh7-Zelllinien aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit als Alternative zu PHH verwendet. Die Zelllinien wurden aus einem humanen Hepatoblastoma bzw. Hepatoma generiert (Knowles et al. 1980; López-Terrada et al. 2009; Nakabayashi et al. 1982). Allerdings weisen sie nur eine geringe Expression von ADME-Genen wie z. B. CYPs und Transporter auf (Jouan et al. 2016). Sie eignen sich aber durch ihre hohe Transfizierbarkeit für die Untersuchung von Regulationsmechanismen, z. B. durch Luciferase-Reportergen-Konstrukte. Dadurch kann beispielsweise überprüft werden, ob bestimmte Gene durch NR reguliert werden oder vorhergesagte miRNA-Bindestellen funktional sind (Thomas et al. 2013; Rieger et al. 2015).

Vor einigen Jahren entstand durch die Entwicklung der HepaRG-Zelllinie eine zusätzliche Alternative zu PHH. Im Gegensatz zu HepG2- und Huh7-Zellen weist diese Hepatoma abgeleitete Zelllinie durch eine hohe Expression der meisten Phase I- und II Enzyme sowie Transporter eine erhöhte metabolische Aktivität und Stabilität auf (Gripon et al. 2002; Aninat et al. 2006; Kanebratt und Andersson 2008; Andersson et al. 2012; Le Vee et al. 2013). HepaRG-Zellen weisen allerdings für CYP2E1 und CYP2D6 eine niedrige Enzymaktivität auf (Aninat et al. 2006; Guillouzo et al. 2007; Turpeinen et al. 2009). Wichtige Einsatzgebiete für HepaRG-Zellen sind metabolische und toxikologische Screenings, z. B. CYP-Inhibitions- oder Induktionsstudien (Turpeinen et al. 2009; Anthérieu et al. 2010; Jackson et al. 2016). Mittlerweile haben sich HepaRG-Zellen auch als Zellmodell für Cholestase, Steatose und entzündliche Bedingungen in der Leber etabliert (Anthérieu et al. 2013; Klein et al. 2015; Rubin et al. 2015; Tolosa et al. 2016; Tanner et al. 2018). Durch die Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) haben undifferenzierte Zellen die Fähigkeit zu hepatozyten- und gallengangähnlichen Zellen zu differenzieren (Cerec et al. 2007). Dadurch ergibt sich allerdings eine Kultivierungsdauer von mindestens sechs Wochen, um ausdifferenzierte, metabolisch aktive HepaRG-Zellen zu erhalten (Gripon et al. 2002; Cerec et al. 2007). Ein weiterer Nachteil ist die schlechte Transfizierbarkeit der Zellen mit Plasmiden (Laurent et al. 2010; Laurent et al. 2013; Demazeau et al. 2017). Für kleine Moleküle wie *small interfering RNAs* (siRNA) oder miRNAs ist die Transfektionseffizienz hingegen sehr gut (Rieger et al. 2015; Keller et al. 2016).

Je nach Fragestellung sollte somit das geeignetste Zellmodell ausgewählt werden. Dabei sind Vorversuche bzw. die Charakterisierung der Zellmodelle unbedingt notwendig.

### 1.5 Ziele der Arbeit

Die starke Herunterregulierung von ADME-Genen in der Leber bei entzündlichen Bedingungen ist schon seit einiger Zeit bekannt. Als zugrunde liegende Mechanismen werden vor allem transkriptionelle Mechanismen, die z. B. über NR wie PXR und RXR $\alpha$  wirken, diskutiert. Dennoch ist unklar, inwieweit diese Mechanismen die enorme Herunterregulierung von ADME-Genen erklären können und ob nicht weitere, bisher unbekannte Mechanismen eine Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Aspekte der Herunterregulierung von ADME-Genen analysiert werden:

- Evaluation von hepatischen Zellmodellen hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit, vor allem von kryokonservierten humanen Hepatozyten
- Rolle von proinflammatorischen Cytokinen und NR mit einem Fokus auf die kombinatorische Wirkung von Cytokinen als auch das Proteinverhalten von NR
- Rolle von entzündungsassoziierten miRNAs als neue Regulationsebene bei der Herunterregulierung der ADME-Gene im Hinblick auf:
  - Validierung funktionaler Bindestellen von miRNAs in ADME-Genen
  - MiRNA-Effekte auf ADME-Genexpression *in vitro*
  - Untersuchungen in Lebergewebe zum möglichen Einfluss von miRNAs *in vivo*
  - Herkunft der entzündungsassoziierten miRNAs

Zusammenfassend sollten diese Untersuchungen das Zusammenspiel zwischen Cytokinen, NR und miRNAs bei der Herunterregulierung der ADME-Gene bei Entzündung näher beleuchten, um den Arzneistoffmetabolismus bei entzündlichen Erkrankungen besser zu verstehen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien.

Reagenz	Firma
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
2X Assay Loading Reagent	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
20X GE Sample Loading Reagent	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
25X Proteinkinase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Acriflavin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Bio-Rad, München, Deutschland
Agarose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Amodiaquin	TRC, Toronto, Kanada
Atorvastatin	TRC, Toronto, Kanada
$\beta$ -Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat dinatrium Salz (NADP <sup>+</sup> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bupropionhydrochlorid	Chemische Synthese, IKP Stuttgart, Deutschland
Chaps (4 %)	Bio-Rad, München, Deutschland
Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
CoverFluid	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Deastreak Reagent	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Serva, Heidelberg, Deutschland
DMEM Medium	GIBCO, Carlsbad, USA
Dulbecco's Phosphat-gepufferte Lösung (PBS)	GIBCO, Carlsbad, USA
Ethanol (100 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Merck, Darmstadt, Deutschland GIBCO, Carlsbad, Deutschland
Glukose-6-phosphat-Mononatrium	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	VWR, Bruchsal, Deutschland
Harnstoff	Serva, Heidelberg, Deutschland
Humanes Insulin, Insuman Rapid (40 I.E.)	Sanofi, Frankfurt, Deutschland
Hydrocortison (50 mg/ml)	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
InVitroGRO CP Medium	Bioreclamation, Baltimore, USA
InVitroGRO HI Medium	Bioreclamation, Baltimore, USA
Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Interleukin-6 (IL-6)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Iodoacetamid (IAA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	GIBCO, Carlsbad, USA
Lipofectamine® RNAiMax	Life Technologies, Carlsbad, USA
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MEM Medium	GIBCO, Carlsbad, USA
Methansäure, Ameisensäure	Fluka, Buchs, Schweiz
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2. Material und Methoden

<b>Nuklease-freies Wasser</b>	Ambion, Austin, USA
<b>Passive Lysis Buffer (5X)</b>	Promega, Madison, USA
<b>Penicilin/Streptomycin (10 000 U/ml, 10 mg/ml)</b>	GIBCO, Carlsbad, USA
<b>Pharmalyte pH 3-10</b>	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
<b>Phenacetin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>PNGase F (15 000 Units)</b>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
<b>Ponceau S-solution</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Propafenon</b>	Knoll, Ludwigshafen, Deutschland
<b>RIPA Lysis- und Extraktionspuffer</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>S-Mephenytoin</b>	TRC, Toronto, Kanada
<b>Serdolit</b>	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Spermin</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>TaqMan® PreAmp Master Mix</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>Tetramethylethyldiamin (TEMED)</b>	GIBCO, Carlsbad, USA
<b>Thioharnstoff</b>	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<b>Tolbutamid</b>	TRC, Toronto, Kanada
<b>Torpedo Antibiotic Mix</b>	Bioreclamation, Baltimore, USA
<b>Tris-HCl</b>	Roth, Karlsruhe, Deutschland
<b>Trypsin-EDTA (0,25 %)</b>	GIBCO, Carlsbad, USA
<b>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Sigma-Aldrich, Deutschland
<b>Tween20</b>	Merck, Darmstadt, Deutschland
<b>William's E Medium (ohne L-Glutamin und Phenolrot)</b>	GIBCO, Carlsbad, USA

### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Tab. 2: Puffer und Lösungen.

<b>Puffer oder Lösung</b>	<b>Bestandteil</b>	<b>Gewicht oder Volumen</b>
<b>APS (10 %)</b>	Ammoniumpersulfat	1 g
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 10 ml
<b>Äquilibriumspuffer</b>	Harnstoff	90 g
	Glycerin	75 g
	RGB (Resolving gel buffer: 1,5 M Tris-Base, 0,4 % SDS pH 8,6)	8,4 ml
	SDS	5 g
	Serdolit	0,5 g (abfiltrieren)
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 250 ml
	<b>BfR-Lysispuffer</b>	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff	454,6 g
	Serdolit	0,5 g (abfiltrieren)
	Chaps (4%)	12 g
	Pharmalyte pH 3-10	6 ml
	Deastreak Reagent	3,6 ml
	Spermin	2,1 g
	BioRad Proteome Grade	ad 300 ml
	Wasser	
<b>DNA-Suspensionspuffer (TE10.01) pH 8,0</b>	Tris-Base	10 mM
	EDTA	0,1 mM
<b>Elektrophoresepuffer (10X)</b>	Tris-Base	150 g
	Glycine	720 g
	SDS (20 %)	250 ml
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 5 000 ml
<b>Laemmli-Probenpuffer (5X)</b>	SDS (20%)	10 g
	1 M Tris Puffer pH 6,8	30,6 ml

## 2. Material und Methoden

	2-Mercaptoethanol	25 ml
	Bromphenolblau	100 mg
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 75 ml
	Glycerol	25 ml
<b>Magermilch (5 %)</b>	Magermilchpulver	10 g
	TBST (1X)	ad 200 ml
<b>SDS (20 %)</b>	SDS	100 g
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
<b>TBS (10X)</b>	NaCl	400 g
	KCl	10 g
	Tris-Base	16,93 g
	Tris-HCl	175 g
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 5 000 ml
<b>TBST (1X)</b>	TBS (10X)	500 ml
	VE-H <sub>2</sub> O	4 500 ml
	Tween20 (50 %)	10 ml
<b>Transferpuffer (Western Blot)</b>	Tris-Base	29 g
	Glycin	14,6 g
	SDS (20 %)	9,25 ml
	Methanol	1 l
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 5 000 ml
<b>Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)</b>	Tris-Base	0,928 g
	Tris-HCl	38,19 g
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
<b>Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)</b>	Tris-Base	69,03 g
	Tris-HCl	28,40 g
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 500 ml
<b>Tris-HCl (1,0 M, pH 8,0)</b>	Tris-HCl	7,878 g
	milliQ-H <sub>2</sub> O	ad 50 ml
	pH auf 8,0 eingestellt	
<b>Tween20 (50 %)</b>	Tween20	250 ml
	milliQ-H <sub>2</sub> O	250 ml

### 2.1.3 Kits

Tab. 3: Kits.

<b>Kit</b>	<b>Firma</b>
<b>Agilent RNA 6000 Nano Kit</b>	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
<b>AlamarBlue™ Cell Viability Reagent</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</b>	Promega, Madison, USA
<b>FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit</b>	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
<b>GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit</b>	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
<b>GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit</b>	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
<b>mirVana™ miRNA Isolation Kit</b>	Life Technologies, Carlsbad, USA
<b>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>Pierce™ LDH Cytotoxicity Assay Kit</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>Qubit® RNA BR Assay Kit</b>	Life Technologies, Carlsbad, USA
<b>SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat</b>	Thermo Scientific, Rockford, USA
<b>TaqMan® Reverse Transcription Reagents</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.4 Geräte

Tab. 4: Geräte.

Gerät	Firma
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
6460 Triple Quadrupole Massenspektrometer	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Biofuge 22R/ Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Biomark® HD Reader	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
Bioruptor UCD-200	Diagenode, Liège, Belgien
EnSpire® Multimode Plattenleser	PerkinElmer, Waltham, USA
Ettan IPGphor III IEF System	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Fastblot B44 Blotting Kammer	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
GeneChip® Hybridization Oven 645	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
GeneChip® Scanner 3000 7G	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
Heracell™ 240 Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
IFC Controller MX	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
Millipore Wasseraufreinigungssystem MilliQ	Millipore, Molsheim, Frankreich
Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 System	Bio-Rad, München, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
NanoDrop™ 2000c	Thermo Scientific, Rockford, USA
Odyssey CLx Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
Olympus CKX 41 Mikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
PEQLAB Elektrophorese Netzgerät EV231	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Deutschland
Qubit® 2.0 Fluorometer	Life Technologies, Carlsbad, USA
TE 77 PWR Blotting System	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
ThermoMixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Veriti 96-well Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Veriti 384-well Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Vortexer Reax control	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
24-Well Platten, zellkulturbehandelt	Corning, Corning, USA
48.48 Dynamic Array™ IFC	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
Amersham Protran Nitrocellulose Blotting Membran (0.45 µm NC)	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
C-Chip Neubauer improved	NanoEnTek, Seoul, Korea
Corning™ BioCoat™ Kollagen I Multiwell Platten (96- und 12-Well)	Corning, Corning, USA
Falcon Tubes (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nuembrecht, Deutschland
FrameStar® FastPlate 96 Well PCR	4titude® Limited, Surrey, Vereinigtes



## 2. Material und Methoden

	Königreich
<b>FrameStar® 384-Well PCR Platten, blauer bzw. grüner Rand</b>	4titude® Limited, Surrey, Vereinigtes Königreich
<b>Microtiterplatten (96-Well)</b>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<b>OptiPlate-96, weiße 96-Well Microtiterplatte</b>	PerkinElmer, Waltham, USA
<b>Qubit® Assay Tubes</b>	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
<b>Rainin Filterpipettenspitzen (10, 20-200 und 1000 µl)</b>	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
<b>Safe-Lock Tubes (0,5, 1,5, 2 ml)</b>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<b>ServaBlue IPG Streifen 3-10 NL/7 cm</b>	Serva, Heidelberg, Deutschland
<b>Stripette® (2, 5, 10, 25 ml)</b>	Corning, Corning, USA

### 2.1.6 TaqMan®-Assays

Tab. 6: TaqMan®-Assays für qRT-PCR Genexpressionsanalyse.

Gen	Assay ID
ABCB1	Hs01067802_m1
ABCG2	Hs00184979_m1
ADH1A	Hs00605167_g1
AHR	Hs00169233_m1
ALDH2	Hs00355914_m1
ARNT	Hs01121918_m1
CCL2	Hs00234140_m1
CRP	Hs00265044_m1
CYP1A1	Hs00153120_m1
CYP1A2	Hs01070374_m1
CYP2A6	Hs00868409_s1
CYP2B6	Hs03044634_m1
CYP2C19	Hs00426380_m1
CYP2C8	Hs00258314_m1
CYP2C9	Hs00426397_m1
CYP2E1	Hs00559368_m1
CYP3A4	Hs00430021_m1
CYP3A5	Hs01070905_m1
CYP3A7	Hs00426361_m1
CYP7A1	Hs00167982_m1
DPYD	Hs00559278_m1
GAPDH	Hs02758991_g1
GSTA2	Hs00747232_mH
GSTM1	Hs01683722_gH
HNF4A	Hs01023298_m1
MRP2	Hs00166123_m1
NAT1	Hs00265080_s1
NAT2	Hs00605099_m1
NFKB1	Hs00765730_m1
NFKBIA	Hs00153283_m1
NR1I2	Hs00243666_m1
NR1I3	Hs00901571_m1
POR	Hs00287016_m1
PPARA	Hs00231882_m1
PPARG	Hs01115513_m1
RPLP0	Hs99999902_m1
RXRA	Hs00172565_m1

## 2. Material und Methoden

<b>SAA1/SAA2</b>	Hs00761940_s1
<b>SLC10A1</b>	Hs00161820_m1
<b>SLC22A7</b>	Hs00198527_m1
<b>SLCO1B1</b>	Hs00272374_m1
<b>SOCS3</b>	Hs02330328_s1
<b>SOD2</b>	Hs00167309_m1
<b>STAT3</b>	Hs00374280_m1
<b>SULT1B1</b>	Hs00234899_m1
<b>TPMT</b>	Hs00909011_m1
<b>UGT1A1</b>	Hs02511055_s1
<b>UGT2B7</b>	Hs00426592_m1

Alle in Tab. 6 dargestellten Reagenzien wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) bezogen.

### 2.1.7 MiRNA-Mimics und -Antagomirs

Tab. 7: MiRNA-Mimic/Antagomirs und siRNAs für Transfektionen.

<b>MiRNA</b>	<b>Typ</b>	<b>ID</b>
<b>miR-130b-3p</b>	Mimic	MC10777
<b>miR-155-5p</b>	Mimic	MC12601
<b>miR-224-5p</b>	Mimic	MC12571
<b>miR-452-5p</b>	Mimic	MC12509
<b>miR-543</b>	Mimic	MC13037
<b>miR-6807-5p</b>	Mimic	MC28605
<b>anti-miR-130b-3p</b>	Antagomir	MH10777
<b>anti-miR-155-5p</b>	Antagomir	MH28440
<b>anti-miR-452-5p</b>	Antagomir	MH12509
<b>anti-miR-6807-5p</b>	Antagomir	MH28605
<b>siPXR</b>	siRNA	s16911
<b>siRXR<math>\alpha</math></b>	siRNA	s12384
<b>Cy® 3 Transfection Control DsiRNA</b>	siRNA	51-01-03-06
<b>Silencer® Select Negative Control No. 2 siRNA (siCTR)</b>	Kontrolle	4390846

Alle in Tab. 7 dargestellten Reagenzien wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Rockford, USA) bezogen, nur Cy® 3 Transfection Control DsiRNA wurde von Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgien) bezogen.

### 2.1.8 Antikörper

Tab. 8: Antikörper für Western Blot.

Target	Ursprung	Verdünnung	Produkt-nummer	Firma	Sekundär-AB	Firma
<b>β-actin</b>	Maus	1:5 000	A5441	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Anti-Maus, IRDye 800 markiert (1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
<b>CYP2C9</b>	Hase	1:2 500	AB10317	Merck Millipore, Billerica, USA	Anti-Hase, IRDye 800 markiert (1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
<b>PXR</b>	Maus	1:500	sc-48340	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	Anti-Maus, IRDye 680 markiert (1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
<b>RXRα (1D)</b>	Maus	1:1 000	PP-K8508-00	R&D systems, Wiesbaden, Deutschland	Anti-Maus, IRDye 680 markiert (1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
<b>RXRα (2D)</b>	Maus	1:500	PP-K8508-00	R&D systems, Wiesbaden, Deutschland	Anti-Maus IgG-HRP (1:2 000)	Seramun Diagnostica Heidesee, Deutschland

### 2.1.9 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tab. 9: Verwendete Zellen und Zelllinien.

Zellen	Beschreibung	Herkunft
<b>HepaRG</b>	Kommerzielle Leberkarzinomzelllinie (generiert aus Zellen einer Kaukasierin), metabolisch aktiv nach Differenzierung mit DMSO	Biopredic International, Saint Grégoire, Frankreich
<b>Kryokonservierte humane Hepatozyten (KHH), Charge: KCB</b>	Isolierte Hepatozyten aus operativ entferntem Lebergewebe, gepoolt aus 10 Patienten, kryokonserviert, getestet auf Ausplattierbarkeit	BioreclamationIVT, Baltimore, USA
<b>Primäre humane Hepatozyten (PHH)</b>	Isolierte Hepatozyten aus frischem operativ entferntem Lebergewebe aus verschiedenen Patienten	Hepacult GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland
<b>HepG2</b>	Kommerzielle Leberkarzinomzelllinie (generiert aus Zellen eines 15-jährigen Kaukasiers)	ATCC, Manassas, USA
<b>Huh7</b>	Kommerzielle Leberkarzinomzelllinie (generiert aus Zellen eines 57-jährigen Japaners)	Epidauros AG, Bernried, Deutschland

2.1.10 Zellkulturmedien

Tab. 10: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

Medium	Bestandteil	Volumen
<b>Hepatozyten Aussaat</b>	William's E Medium	450 ml
	FCS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Humanes Insulin (40 I.E.)	400 µl
	Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
	Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x)	5 ml
	Hepes (1 M)	7,5 ml
	Hydrokortison (50 mg/ml)	8 µl
<b>Hepatozyten Kultivierung</b>	William's E Medium	450 ml
	FCS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Humanes Insulin (40 I.E.)	400 µl
	DMSO	450 µl
	Dexamethason (1 mM)	50 µl
<b>HepaRG Wachstum</b>	William's E Medium	450 ml
	FCS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml
	Humanes Insulin (40 I.E.)	2 ml
	Hydrokortison (50 mg/ml)	200 µl
<b>HepaRG Differenzierung (1%)</b>	HepaRG Wachstumsmedium	49.5 ml
	DMSO	0.5 ml
<b>HepaRG Differenzierung (2%)</b>	HepaRG Wachstumsmedium	49 ml
	DMSO	1 ml
<b>HepG2</b>	DMEM Medium	450 ml
	FCS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	5 ml
	Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
<b>Huh7</b>	MEM Medium	450 ml
	FCS	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (10 000 U/ml)	5 ml
	L-Glutamin (200 mM)	5 ml

2.1.11 Plasmide

Tab. 11: Verwendete pmirGLO Plasmiderivate für Luciferase-Reporter-Assays.

Plasmidnamen	Relevante Sequenzen
<b>CYP2B6_miR-130b_WT</b>	GTTTAAACCCTCCACCCCGGGGATCAAGCAACTCTCCTGCCTCAGC CTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCACTACCACGCTTGGCTAA TTTTTGTATTTTGTAGTAGAGATGGGGTTTCACTGTGTCTAGA
<b>CYP2B6_miR-130b_WTx3</b>	GTTTAAACCGGCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCACTAGT GCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGCATGCACTAGTGCCTCCCTAG TAGCTGGGATTACAGGCATGCACTAGTGTCTAGA
<b>CYP2B6_miR-130b_Mut</b>	GTTTAAACCCTCCACCCCGGGGATCAAGCAACTCTCCTGCCTCAGC CTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGCACCACGCTTGGCTAATTTTTGT ATTTTGTAGTAGAGATGGGGTTTCACTGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-155_WT</b>	GTTTAAACATAGAGAAAGATGATTTGTGTATTATAATTCAAAGGCATTT CTTCTCTGCATGTTCTAAACAAAAAGCATTATTATTTGCTGAGTCAGG TTATTAGACCTTCCCTTTTGTGCATAATGCATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-155_WTx3</b>	GTTTAAACCGGTTTCTTCTCTGCATGTTCTAAACAAAAAGCATTAGTG TTTCTTCTCTGCATGTTCTAAACAAAAAGCATTAGTGTCTTCTCTGC

## 2. Material und Methoden

	ATGTTCTAAACAAAAAGCATTAGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-155_Mut</b>	GTTTAAACATAGAGAAAGATGATTTGTGTATTATAAATCAAAGGCATTTCTTCTCTGCATGTTCTAAACAAAATTATTTGCTGAGTCAGGTTATTAGACCTTCCTTCCTTTGTGCATAATGCATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-543_WT</b>	GTTTAAACCTGATCTGCCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTA CAGGAGTGAGACACTGTGCCTGGTCTAATGTTACTTTAAAGTGTCATTACTTTATCTCTAAATAAAGAATCAGGTTACTTTTATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-543_WTx3</b>	GTTTAAACCGGACAGGAGTGAGACACTGTGCCTGGTCTAATGTTAGTGACAGGAGTGAGACACTGTGCCTGGTCTAATGTTAGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-543_Mut</b>	GTTTAAACCTGATCTGCCTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTA CAGGAGTGAGACACTGTGCCTGGTCTCTTTAAAGTGTCATTACTTTTATCTCTAAATAAAGAATCAGGTTACTTTTATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_WT</b>	GTTTAAACTGGAGACTGTAGTGGATAATCTGTTTTCTGCCTATTTCA GCTCCTAAAGGCTGCCTGCATTCTTGGCTCATGAACTCCTTTTTCTT TCACTCCAAACACTTGCTTCTTTTGTACATCTCTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_WTx3</b>	GTTTAAACCGGCAGCTCCTAAAGGCTGCCTGCATTCTTGGCTCAGT GCAGCTCCTAAAGGCTGCCTGCATTCTTGGCTCAGTGCAGCTCCTA AAGGCTGCCTGCATTCTTGGCTCAGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_Mut</b>	GTTTAAACTGGAGACTGTAGTGGATAATCTGTTTTCTGCCTATTTCA GCTCCTAAAGGCTGCCTGCATTCTTGAACCTCCTTTTTCTTCACTCC AAACACTTGCTTCTTTTGTACATCTCTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-130b_WT</b>	GTTTAAACTCTTCATGTCCAGACATTATTTAGCCTACCATACTATTATT ATACCCATTTGAACAACCAACAATTGCACTGATGATCTGTTAAGCAT CTTGTTCAAGGTCACACAGCTTTTTAAGTGTCATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-130b_WTx3</b>	GTTTAAACCGGATTATACCCATTTGAACAACCAACAATTGCACTGTG ATTATACCCATTTGAACAACCAACAATTGCACTGTGATTATACCCAT TTGAACAACCAACAATTGCACTGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-130b_Mut</b>	GTTTAAACTCTTCATGTCCAGACATTATTTAGCCTACCATACTATTATT ATACCCATTTGAACAACCAACAAGATGATCTGTTAAGCATCTTGTTCA AAGGTCACACAGCTTTTTAAGTGTCATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_WT_beid e Bindestellen</b>	GTTTAAACTTGTATTTCTTCCCTAAAATACATATTTTCATATGAGAAGAG AACTTTATTTGGCTCACTAATGAATACCAGCCACCTGAAACACTGTTT AGAAGATACTGGCTCAATAAATATTTAATGAATGAATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_WTx3</b>	GTTTAAACCGGTATTTTCATATGAGAAGAGAACTTTATTTGGCTCAGTG TATTTTCATATGAGAAGAGAACTTTATTTGGCTCAGTGTATTTTCATATGA AAGAGAACTTTATTTGGCTCAGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_Mut</b>	GTTTAAACTTTATTTTTATTGTTTGTATTTCTTCCCTAAAATACATATTT CATATGAGAAGAGAACTTTATTCTAATGAATACCAGCCACCTGAAACA CTGTTTAGAAGATACTGGCTCAATATCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_WTx3</b>	GTTTAAACCGGGCCACCTGAAACACTGTTTAGAAGATACTGGCTCAG TGGCCACCTGAAACACTGTTTAGAAGATACTGGCTCAGTGGCCACCT GAAACACTGTTTAGAAGATACTGGCTCAGTGTCTAGA
<b>CYP2C19_miR-6807_Mut</b>	GTTTAAACGAGAAGAGAACTTTATTTGGCTCACTAATGAATACCAGCC ACCTGAAACACTGTTTAGAAGATAATAAATATTTAATGAATGAATGACT ACTTAATGAATTAATGAATGAATGTTCTAGA
<b>CYP3A4_miR-224_WT</b>	GTTTAAACTGTTGGCGTGGGGCCTTTGTGCAAGACTAGAATTTGATTAT TAACATAGGTGAAAGTTAATCCACTGTGACTTTGCCATTGTTTAGAA AGAATATTCATAGTTAATTATGCCTTTTTTATTCTAGA
<b>CYP3A4_miR-224_WTx3</b>	GTTTAAACCGGATTAACATAGGTGAAAGTTAATCCACTGTGACTTGTG ATTAACATAGGTGAAAGTTAATCCACTGTGACTTGTGATTAACATAGG TGAAAGTTAATCCACTGTGACTTGTGTCTAGA
<b>23_CYP3A4_mi R-224_Mut</b>	GTTTAAACTGTTGGCGTGGGGCCTTTGTGCAAGACTAGAATTTGATTAT TAACATAGGTGAAAGTTAATCCACTTGGCCATTGTTTAGAAAGAATAT TCATAGTTAATTATGCCTTTTTTATTCTAGA
<b>CYP3A4_miR-452_WT</b>	GTTTAAACTCCCTACACCTCTTGCATTCCATCCTCAACACCCAACTGT CTCGATGCAATGAACACTTAATAAAAAACAGTCGATTGGTCAATTGAT TGAGCAATAAGCCTTCTAGA

## 2. Material und Methoden

<b>CYP3A4_miR-452_WTx3</b>	GTTTAAACCGGGTCTCGATGCAATGAACACTTAATAAAAAACAGTGTG GTCTCGATGCAATGAACACTTAATAAAAAACAGTGTGGTCTCGATGC AATGAACACTTAATAAAAAACAGTGTGTCTAGA
<b>CYP3A4_miR-452_Mut</b>	GTTTAAACTCCCTACACCTCTTGCATTCCATCCTCAACACCCAAGTGT CTCGATGCAATGAACACTTAATAAACGATTGGTCAATTGATTGAGCAA TAAGCCTTCTAGA
<b>CYP2C9_miR-155_WT</b>	GTTTAAACATAGAGAAATATGATTTGTGTATTATAATTCAAAGGCATTT CTTTTCTGCATGTTCTAAATAAAAAGCATTATTATTTGCTGATCTAGA
<b>CYP2C9_miR-155_WTx3</b>	GTTTAAACCGGTTTCTTTTCTGCATGTTCTAAATAAAAAGCATTAGTGT TTCTTTTCTGCATGTTCTAAATAAAAAGCATTAGTGTCTTTTCTGCA TGTTCTAAATAAAAAGCATTAGTGTCTAGA
<b>CYP2C9_miR-155_Mut</b>	GTTTAAACATAGAGAAATATGATTTGTGTATTATAATTCAAAGGCATTT CTTTTCTGCATGTTCTAAATAAAAATTATTTGCTGATCTAGA,
<b>CYP2C8_miR-452_WT</b>	GTTTAAACTCTTTAACCCCATAGGCGAAAAAATGGAGCAGGGACATG AGGGCACTCAAGCACAAAGCCTCTATAAACAGTCAGAACCAGTACAG CAGGTTCAAGTGGTCTCTTATCAGAATAAAGTTACTTCTAGA
<b>CYP2C8_miR-452_WTx3</b>	GTTTAAACCGGGAGGGCACTCAAGCACAAAGCCTCTATAAACAGTGT GGAGGGCACTCAAGCACAAAGCCTCTATAAACAGTGTGGAGGGCAC TCAAGCACAAAGCCTCTATAAACAGTGTGTCTAGA
<b>CYP2C8_miR-452_Mut</b>	GTTTAAACTCTTTAACCCCATAGGCGAAAAAATGGAGCAGGGACATG AGGGCACTCAAGCACAAAGCCTCTATCAGAACCAGTACAGCAGGTTT AGTGGTCTCTTATCAGAATAAAGTTACTTCTAGA
<b>CAR_miR-155_WT</b>	GTTTAAACGCAGCGAAGGCCCGGGATCGGTTTCTGTATGCGAAGTT GCTAGGCCTGCTGGCTGAGCTCCGGAGCATTAAAGGCTACGGG TACCAAATCCAGCACATCCAGGGCCTGTCTGCCATGATCTAGA
<b>CAR_miR-155_WTx3</b>	GTTTAAACCGGTTGCTAGGCCTGCTGGCTGAGCTCCGGAGCATTAA GTGTTGCTAGGCCTGCTGGCTGAGCTCCGGAGCATTAAAGTGTGCTA GGCCTGCTGGCTGAGCTCCGGAGCATTAAAGTGTCTAGA
<b>CAR_miR-155_Mut</b>	GTTTAAACGCAGCGAAGGCCCGGGATCGGTTTCTGTATGCGAAGTT GCTAGGCCTGCTGGCTGAGCTCCGGTGAGGCCTACGGGTACCAAAT CCAGCACATCCAGGGCCTGTCTGCCATGATCTAGA
<b>RXRA_miR-155_WT</b>	GTTTAAACGTGGCTTCTCCGTACGATTGTCTCTGAAACATCGTGGCC TCAGGTGCCAGGGTTTGTATGGACAGTAGCATTAGAATTGTGGAAAAG GAACACGCAAAGGGAGAAGTGTGAGAGGAGAAACAATCTAGA
<b>RXRA_miR-155_WTx3</b>	GTTTAAACCGGCTCAGGTGCCAGGGTTTGTATGGACAGTAGCATTAGT GCTCAGGTGCCAGGGTTTGTATGGACAGTAGCATTAGTGTGCTCAGGTG CCAGGTTTGTATGGACAGTAGCATTAGTGTCTAGA
<b>RXRA_miR-155_Mut</b>	GTTTAAACGTGGCTTCTCCGTACGATTGTCTCTGAAACATCGTGGCC TCAGGTGCCAGGGTTTGTATGGACAGTGAATTGTGGAAAAGGAACAC GCAAAGGGAGAAGTGTGAGAGGAGAAACAATCTAGA
<b>RXRA_miR-130b_WT</b>	GTTTAAACCGGCCTGGCGCTCCTCCCGCAGGCTCTGCCCCCGGGCT CCGGTGGTGCGGGGCCCTCTCAGGTTGAACTCGCCTCTTTTGCCT GGAAGGCCCTCCCTTTGGCCTGAGTACTTTTCCCGTTCACGCCTCAG TCC TCTAGA
<b>RXRA_miR-130b_WTx3</b>	GTTTAAACCGGGGCCCTCTCAGGTTGAACTCGCCTCTTTTGCCTGT GGGCCCTCTCAGGTTGAACTCGCCTCTTTTGCCTGTGGGCCCTCTC AGGTTGAACTCGCCTCTTTTGCCTGTG TCTAGA
<b>RXRA_miR-130b_Mut</b>	GTTTAAACCGGCCTGGCGCTCCTCCCGCAGGCTCTGCCCCCGGGCT CCGGTGGTGCGGGGCCCTCTCAGGTTGAACTCGCCTCTTGAAGGCC CTCCCTTTGGCCTGAGTACTTTTCCCGTTCACGCCTCAGTCC TCTAGA
<b>komp. miR-155-5p</b>	GTTTAAACCTAGAACCCTATCACGATTAGCATTAAATTCTAGA
<b>komp. miR-452-5p</b>	GTTTAAACCTAGATCAGTTTCTCTGCAAACAGTTTTCTAGA
<b>komp. miR-6807-5p</b>	GTTTAAACCTAGACCTCTCCATTCCACTGGCTCACTTCTAGA
<b>komp. miR-543</b>	GTTTAAACCTAGAAAGAAGTGCACCGCGAATGTTTTTCTAGA

## 2. Material und Methoden

<b>komp. miR-224-5p</b>	GTTTAAACCTAGAAACGGAACCACTAGTGACTTGTTCTAGA
<b>komp. miR-130b-3p</b>	GTTTAAACCTAGATGCCCTTTCATCATTGCACTGTTCTAGA

Alle DNA-Fragmente (Tab. 11) wurden von der Firma GenScript Biotech Corp. (New Jersey, USA) synthetisiert und in das Plasmid pmirGLO (Promega, Madison, USA) kloniert.

### 2.1.12 Software und Datenbanken

Tab. 12: Software und Datenbanken.

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
<b>Affymetrix® GeneChip Command Console® Software (AGCC)</b>	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
<b>Affymetrix® Transcriptome Analysis 4.0 Console (TAC) Software</b>	Affymetrix Inc., Santa Clara, USA
<b>Fluidigm Real-Time PCR Analysis</b>	Fluidigm, Amsterdam, Niederlande
<b>GraphPad Prism 5.0</b>	GraphPad Software, La Jolla, USA
<b>Image Studio™ Software v3.1</b>	LI-COR Biosciences, Bad Homburg, Deutschland
<b>MS Office 2010</b>	Microsoft, Redmond, USA
<b>SDS Software v2.4 für 7900HT Fast</b>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<b>TargetScan v7.2</b>	<a href="http://www.targetscan.org/">http://www.targetscan.org/</a>





### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur-Methoden

Die verschiedenen hepatischen Zellmodelle (Tab. 9) wurden prinzipiell unter vergleichbaren Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellviabilität mithilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt.

##### 2.2.1.1 Primäre humane Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten (PHH) wurden durch die Hepacult GmbH (Planegg/Martinsried, Deutschland) aus Gewebeproben von Leberresektionen gewonnen. Laut Donoren-Informationsblatt wurden die Präparationen im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und waren von der Ethikkommission der Ludwigs-Maximilians-Universität München genehmigt. Eine unterschriebene Patienteneinverständniserklärung liegt der Hepacult GmbH von jedem Spender vor. PHH wurden als Zellsuspension auf Eis 16-20 h nach der Präparation geliefert und in Kultur genommen. Nach Ankunft wurden die Zellen sofort durch gezieltes Wirbeln resuspendiert. Danach wurden die Zellen in ein 50 ml Falcongefäß mit eiskaltem PBS überführt und bei 58 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem weiteren Waschschrift in eiskaltem PBS resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in vorgewärmtes Hepatozyten Aussaatmedium (Tab. 10) aufgenommen und vereinzelt. Es wurden 400 000 Zellen in einem mL Medium pro Well in einer kollagenbeschichteten 12-Well Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium für Behandlungen mit Cytokinen etc. durch Hepatozyten Kultivierungsmedium ersetzt.

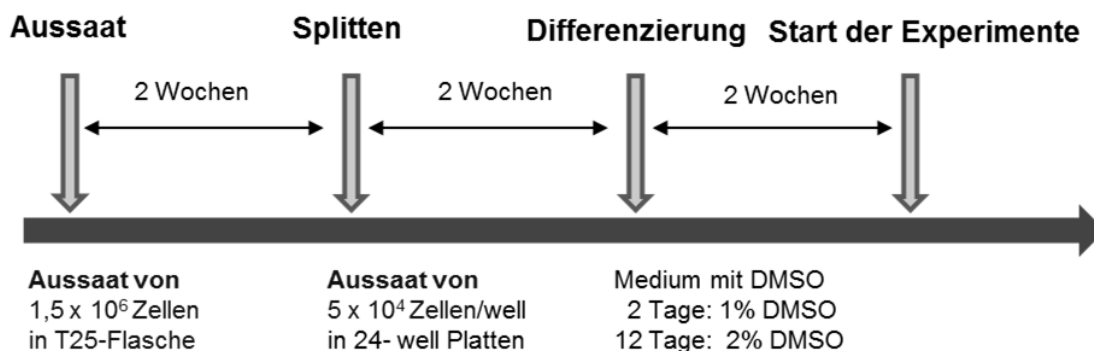
##### 2.2.1.2 Kryokonservierte humane Hepatozyten

Kryokonservierte humane Hepatozyten (KHH) wurden durch die Firma Bioreclamation (Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt und im Flüssigstickstofftank gelagert. Dabei handelte es sich um gepoolte Hepatozyten von zehn verschiedenen Donoren aus Leberresektionen, die mit einer bestimmten Methode kryokonserviert worden waren (*LiverPool™ 10-Donor mixed gender pooled cryoplateable human hepatocytes*, Charge: KCB). Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurde das Fläschchen unter leichtem Schütteln im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Danach wurden die Zellen in vorgewärmtes InVitroGRO CP Medium transferiert. Durch Invertieren wurden die Zellen resuspendiert. Es wurden 49 000 Zellen in 100 µl Medium pro Well in einer

kollagenbeschichteten 96-Well Platte ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium zu InVitroGRO HI Medium (serumfrei) gewechselt und Behandlungen mit Cytokinen etc. begonnen. Beide Medien wurden mit dem Torpedo Antibiotic Mix (1:45) versetzt.

### 2.2.1.3 HepaRG-Zellen

Ursprünglich entstammten HepaRG-Zellen dem Lebertumorgewebe einer an Hepatitis C erkrankten Patientin (Gripon et al. 2002). HepaRG-Zellen zeigen nicht nur eine hepatozytenähnliche Morphologie, sondern sie sind außerdem in der Lage, nach längerer Kultivierung (~2 Wochen) bei höheren DMSO Konzentrationen (bis 2 %) sich weiter zu differenzieren und 3D-Strukturen mit Gallengängen auszubilden. Eine im Vergleich zu anderen Leberkarzinomzelllinien außergewöhnliche Eigenschaft dieser Zellen ist die Expression von leberspezifischen Funktionen wie z. B. die Plasmaproteinproduktion und funktionelle Entgiftungsenzyme (z. B. Cytochrome P450). Daher eignet sich diese Zelllinie aufgrund ihrer Beibehaltung metabolischer Aktivitäten zur Anwendung für Fragestellungen im Bereich der ADME von Arzneistoffen (Gripon et al. 2002). In Abb. 4 ist das spezielle Differenzierungsprotokoll mit DMSO zu sehen, welches angewendet wird, um hohe Expressionslevel der CYPs zu erhalten (Gripon et al. 2002; Klein et al. 2015).



**Abb. 4: Protokoll zur Kulturvierung von HepaRG-Zellen.** Nach dem Auftauen eines Aliquots wurden HepaRG-Zellen für 2 Wochen in einer T25 Flasche mit HepaRG Wachstumsmedium kultiviert (Tab. 10). Danach wurden sie für 3 min bei 37 °C trypsiniert (Trypsin-EDTA (0,25%)) und auf 24-Well Platten (50 000 Zellen pro Well) transferiert, in denen sie für weitere 2 Wochen kultiviert wurden. Nach dieser Expansionsphase wurden die Zellen mit DMSO-haltigen Differenzierungsmedium für 2 Wochen behandelt. Nach der Differenzierung waren die Zellen in Experimenten einsetzbar.

Abhängig vom Kultivierungsstadium wurden unterschiedliche Zellkulturmedien verwendet (siehe Abb. 4 und Tab. 10).

### 2.2.1.4 HepG2- und Huh7-Zellen

HepG2- und Huh7-Zellen wurden bei ATCC (Manassas, USA) bzw. Epidauros AG (Bernried, Deutschland) erworben. Beide Zelllinien wurden in T75 Flaschen im jeweiligen Medium kultiviert und zweimal pro Woche 1:5 gesplittet, wenn sie ca. 85 % Konfluenz erreicht hatten (Tab. 10). Dabei wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 1X PBS gewaschen, bevor die Zellen mit 0,25%igem Trypsin für 5 min bei 37 °C behandelt wurden. Danach wurden die Zellen in neuem Medium aufgenommen und resuspendiert, bevor sie in eine neue Zellkulturflasche mit Medium überführt wurden. Die Zellen wurden nach der Zellzahlbestimmung in 96-Well Platten für Luciferase-Reporter-Assays ausgesät.

### 2.2.1.5 Behandlungen mit Cytokinen

HepaRG-Zellen, PHH und KHH wurden mit den Cytokinen IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  behandelt, um eine Akut-Phase-Reaktion zu induzieren. Die Cytokine wurden dazu in PBS/0,1 % (g/v) BSA angesetzt und im Versuch bei HepaRG-Zellen in 2%igem Differenzierungsmedium verdünnt (Tab. 13). Als Kontrollen wurden Zellen mit der gleichen Menge an Lösungsmittelkontrolle PBS/0,1 % BSA behandelt. Die Behandlungen wurden alle 24 h erneuert.

Tab. 13: Konzentrationen der Cytokinbehandlungen.

Cytokin	Lösungsmittel	Stockkonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Endkonzentration (ng/ml)
IL-6	PBS/BSA 0,1%	1	10
IL-1 $\beta$	PBS/BSA 0,1%	0,5	5
TNF- $\alpha$	PBS/BSA 0,1%	1	10

### 2.2.1.6 Behandlungen mit Acriflavin

Um den Gesamtbeitrag endogener miRNAs an der Herunterregulierung der ADME-Gene bei entzündlichen Bedingungen in Hepatozyten zu analysieren, wurde Acriflavin (AF) verwendet, ein Acridinfarbstoff. Dieser Stoff verhindert die Bindung zwischen der miRNA und dem RISC. Dadurch können miRNAs nicht mehr post-transkriptionell wirken und ihre Ziel-mRNA wird nicht mehr degradiert bzw. weiter in das Protein translatiert. Die miRNAs sind somit nicht mehr funktional (Watashi et al. 2010; Lauschke et al. 2016). Differenzierte HepaRG-Zellen wurden mit Cytokinen bzw. Cytokinen in Kombination mit AF für 72 h behandelt (siehe Tab. 14).

PBS diente dabei als Lösungsmittelkontrolle. Die Behandlungen wurden alle 24 h erneuert.

**Tab. 14: Behandlungen und eingesetzte Konzentrationen von Acriflavin und Cytokinen.**

<b>Behandlung</b>	<b>Acriflavin (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>Cytokin (ng/ml)</b>
<b>IL-6</b>	-	10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	-	5
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	-	10
<b>PBS</b>	-	
<b>AF + IL-6</b>	2	10
<b>AF + IL-1<math>\beta</math></b>	2	5
<b>AF + TNF-<math>\alpha</math></b>	2	10
<b>AF + PBS</b>	2	

### 2.2.1.7 Zellviabilitätstests

Um Auswirkungen von Acriflavin auf die Zellviabilität zu testen, wurden zwei verschiedene Zellviabilitätstests verwendet: LDH-Assay und Alamar-Blue-Assay.

#### 2.2.1.7.1 LDH-Assay

Der LDH-Assay beruht auf der Detektion eines Farbproduktes, dessen Bildung unter anderem von Laktatdehydrogenasen katalysiert wird. Bei der Konversion von Laktat zu Pyruvat entsteht aus  $\text{NAD}^+$  durch Reduktion NADH, das von der Diaphorase benutzt wird, um ein Tetrazoliumsalz zu einem roten Formazanprodukt zu reduzieren. Dieses Produkt kann bei 490 nm photometrisch gemessen werden. Kommt es durch die Zerstörung der Plasmazellmembran, z. B. durch cytotoxische Substanzen, zu einem Verlust von Laktatdehydrogenasen, ist die Menge der Formazanentstehung proportional zu der Menge an ausgeschiedenen LDH in das Medium. Somit lässt sich die Cytotoxizität im Mediumüberstand feststellen. Bei behandelten HepaRG-Zellen wurden 50  $\mu\text{l}$  Mediumüberstand pro Well (24-Well Platte) in eine 96-Well Platte überführt und mit 50  $\mu\text{l}$  Reaktionsmix gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden 50  $\mu\text{l}$  Stopplösung hinzugegeben und die Absorption bei 490 nm und 680 nm am EnSpire® Plattenleser gemessen. Um die LDH Aktivität zu bestimmen, wurden die 680 nm Absorptionswerte (Hintergrundsignal durch das Messinstrument) von den 490 nm Absorptionswerten abgezogen. Jeder Zeitpunkt wurde in Triplikaten gemessen (24-72 h). Die Viabilität wurde auf die Kontrolle bzw. unbehandelte Zellen bezogen.

#### 2.2.1.7.2 Alamar-Blue-Assay

Resazurin, die aktive Substanz des AlamarBlue™ Cell Viability Reagent, ist ein blauer, nicht-fluoreszierender Farbstoff, der nicht cytotoxisch, aber zellgängig ist. Wenn es in die Zellen gelangt, wird es dort zu Resorufin reduziert und ein roter, fluoreszierender Farbstoff entsteht. Dieser Vorgang findet kontinuierlich in vitalen Zellen statt, sodass es

zu einer allgemeinen Fluoreszenzerhöhung und Farbintensivierung kommt, welche beide gemessen werden können. Bei behandelten HepaRG-Zellen wurde das Medium abgesaugt und 500 µl HepaRG-Medium pro Well (mit jeweils 50 µl Alamar Blue Reagenz (10X) gemischt) hinzugegeben. Danach erfolgte eine Inkubation für 1 h bei 37 °C. Dann wurden 100 µl pro Well in eine transparente 96-Well Platte überführt und die Fluoreszenz bei 550 nm am EnSpire® Plattenleser gemessen. Als Negativkontrolle wurde die Fluoreszenz von Medium mit Alamar Blue gemessen und von jeder Probe als Hintergrund abgezogen. Jeder Zeitpunkt wurde in Triplikaten gemessen und keine Zellen wurden mehrmals mit Alamar Blue-Reagenz behandelt (24-72 h). Die Viabilität wurde auf die Kontrolle bzw. unbehandelte Zellen bezogen.

### **2.2.1.8 Transfektion mit miRNA-Mimics/Antagomirs**

HepaRG-Zellen wurden zur Untersuchung der miRNA-Effekte mit sogenannten "miRNA-Mimics" bzw. "miRNA-Antagomirs" behandelt (Tab. 7). Dabei handelt es sich um chemisch-modifizierte doppelsträngige bzw. einzelsträngige RNAs, die endogene miRNAs imitieren bzw. inhibieren. Jede miRNA-Mimic bzw. Antagomir wurde in William's E Medium ohne Zusätze verdünnt und mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMax (1,5 µl bei 20 nM) gemischt. Je nach Versuch wurden 1 nM bzw. 60 nM miRNA-Mimic bzw. Antagomir eingesetzt, als Kontrolle wurde die Negative Control No. 2 siRNA (siCTR) transfiziert. Der Transfektionsmix wurde für 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Mediumswechsel durchgeführt, danach erfolgte die Zugabe des Transfektionsmixes (24-Well Platten: 400 µl Medium und 100 µl Transfektionsmix).

### **2.2.2 Leberbank**

#### **2.2.2.1 Sammlung der Lebergewebeproben**

Über mehrere Jahre war am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart eine Lebergewebebank etabliert worden. Diese Sammlung besteht aus Lebergewebsproben und dazugehörigen EDTA-Blutproben von 150 Spendern kaukasischer Abstammung (79 Frauen und 71 Männer). Die Proben waren im Rahmen von leberchirurgischen Eingriffen am Campus Virchow in Berlin gewonnen worden. Die Studie war durch die Ethikkommissionen der Medizinischen Fakultäten der Charité (Humboldt Universität Berlin) und der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt worden. Um die Verwendung von tumorösen Gewebe auszuschließen, waren die Leberproben von einem Pathologen begutachtet worden. Die Leberproben wurden

schockgefroren und bei -80 °C bis zur Zellfraktionierung gelagert. Zusätzlich waren sowohl demographische als auch klinische Parameter; wie Geschlecht, Alter, Rauchgewohnheiten, Alkoholkonsum (selbstberichtet), präoperative Medikation, präoperative Leberserumparmeter (z. B. CRP) und Grund des Eingriffes verfügbar. Ausschlusskriterien waren eine virale Hepatitis, Zirrhose und Alkoholabusus (Klein et al. 2010; Nies et al. 2009).

### 2.2.2.2 Generierung der Leberbankpools

Im Rahmen der vorausgegangenen Masterarbeit war die miRNA-Expression bei entzündlichen Bedingungen (erhöhtes CRP) durch einen Pool-Ansatz in Leberbankproben untersucht worden (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016). Dafür war der Status des Entzündungsmarkers CRP der jeweiligen Patienten als Kriterium der Poolbildung herangezogen worden (Tab. 15). Der Kontrollpool bestand nur aus Proben von Patienten, die keine Cholestase, Steatose oder NASH hatten. Jede Probe war nur einmal verwendet und gleichwertig dem jeweiligen Pool hinzugefügt worden. Die Poolproben waren auf Microarrays aufgetragen worden, um die miRNA-Expression zu bestimmen (siehe 2.2.3.2). Die Ergebnisse wurden in Kugler et al. (2019) publiziert.

**Tab. 15: Zusammensetzung der Leberbankpools.** Leberbankpools wurden aufgrund des CRP Status der Patienten generiert.

Pool	Anzahl der Proben (n)	Beschreibung
Kontrolle	10	Kein erhöhtes CRP (< 1 mg/l), keine Cholestase, Steatose oder NASH
CRP	7	> 10 mg/l CRP

### 2.2.2.3 Korrelationsanalyse zwischen miRNA-Expression und CYP-Phänotypen

Die Expression für ausgewählte hochregulierte miRNAs war in den Einzelleberproben mittels qRT-PCR validiert worden (Kontrolle, n = 10; CRP, n = 7; Cholestase, n = 17) (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016). Die Ergebnisse wurden in Kugler et al. (2019) publiziert. CYP/POR-mRNA-Expressionsdaten der Einzelleberproben lagen bereits vor (Rieger et al. 2013). Diese waren mittels qRT-PCR gemessen und auf RPLP0 normalisiert worden. Die Proteinexpression bzw. Enzymaktivitäten von mikrosomalen CYPs und POR waren, wie bereits in Rieger et al. (2013) beschrieben, mittels Western Blot bzw. LC-MS/MS gemessen worden.

### **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 RNA-Isolierung und Quantifizierung**

##### **2.2.3.1.1 RNA-Isolierung aus Zellen**

Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde das mirVana™ miRNA Isolation Kit verwendet. Kultivierte Zellen wurden mit 1X PBS gewaschen und je nach Wellgröße mit 300 bzw. 600 µl Lysis/Binding Solution (24-Well bzw. 12-Well Platte) versetzt. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese in ein Eppendorfgefäß überführt und gevortext, um ein homogenes Lysat zu erhalten. Bei einer 24-Well Platte wurden zwei Wells zu einer Probe vereinigt, um die Well-zu-Well Variation zu reduzieren. Die Zelllysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Zur RNA-Isolierung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und jeweils mit 60 µl miRNA Homogenate Additive versetzt. Danach wurden die Proben gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Für die Extraktion wurden 600 µl Phenol-Chloroform pro Probe hinzugefügt und die Proben 60 s gevortext, bevor die Proben für 5 min bei 10 000 x g bei RT zentrifugiert wurden. Die dabei entstandene wässrige Phase, die RNA enthält, wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 1,25-fachen Volumen 100%igen Ethanol gemischt. Jedes Gemisch wurde auf einen Filtereinsatz übertragen und für 30 s bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Der erste Waschschrift erfolgte mit 700 µl miRNA Wash Solution 1 pro Probe mit einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt für 30 s bei 10 000 x g. Daraufhin folgten zwei weitere Waschschriffe mit 500 µl Wash Solution 2/3 mit jeweiliger Zentrifugation. Nach jedem Schritt wurde der Durchfluss verworfen. Danach wurden die Proben für 60 s zentrifugiert, um die restliche Flüssigkeit aus dem Filtereinsatz zu entfernen. Am Ende wurde die RNA mit 80 µl nukleasefreiem Wasser (auf 95 °C erhitzt vor Gebrauch) eluiert und durch Zentrifugation (30 s bei 10 000 x g) zurückgewonnen. Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurden mithilfe des NanoDrop™ Spektrometers bestimmt. Die Reinheit wurde anhand der Absorptionsverhältnisse A260/230 (Salz- und Peptidverunreinigung) und A260/280 beurteilt. Proben mit einem A260/280 Verhältnis von ca. 2,0 wurden für weitere Analysen verwendet.

##### **2.2.3.1.2 RNA-Isolierung aus Gewebe**

MirVana™ Gesamt-RNA-Präparationen aus Lebergewebe lagen bereits vor (Rieger et al. 2013). Die RNA Konzentration wurde mit dem Qubit® RNA BR Assay Kit quantifiziert. Durch die Verwendung eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes ist dieser Assay sehr selektiv für RNA, eine Quantifizierung von DNA, Protein und freien

Nukleotiden wird verhindert. Auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer wurde die Integrität der RNA mittels des Agilent RNA 6000 Nano Kits bestimmt. Die sogenannte RNA Integrity Number (RIN) zeigt, ob die RNA in einem intakten oder degradierten Zustand ist. Hohe Integrität der RNA ist eine wichtige Voraussetzung für weiterführende Experimente (Schroeder et al. 2006). Aus diesem Grund wurden nur Proben in weiteren Experimenten verwendet, die eine RIN >7 hatten (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016; Kugler et al. 2019).

### **2.2.3.2 MiRNA Profiling – Microarray-Analysen**

Um die miRNA-Expression in den Leberbankpools (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016; Kugler et al. 2019) bzw. in cytokinbehandelten HepaRG-Zellen zu untersuchen, wurden Microarray-Analysen mithilfe von Affymetrix GeneChip® 4.0 Arrays durchgeführt. Das Verfahren besteht aus den Schritten Probenvorbereitung, Anfügen eines Poly(A)-Schwanzes, Ligation, Hybridisierung auf den Array, Waschen und Färben des Arrays und Analyse der Microarraydaten. Für das Markieren der RNA-Moleküle wurde das FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit verwendet. Das GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit wurde eingesetzt, um den Hybridisierungsvorgang zu kontrollieren (Hybridisierung Kontrollstocklösungen). Für das Waschen und Färben der Arrays wurde das GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit eingesetzt.

#### **2.2.3.2.1 Probenvorbereitung**

Die Methode wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Proben (Leberbankpools als auch cytokin- und kontrollbehandelte HepaRG-Zellen) wurden auf 500 ng Gesamt-RNA in 8 µl nukleasefreiem Wasser eingestellt. Die Probenvorbereitung wurde auf einer 96-Well Platte durchgeführt.

#### **2.2.3.2.2 Anhängen eines Poly(A)-Schwanzes**

Nachdem die Proben vorbereitet waren, wurde die 96-Well Platte auf Eis gestellt und 2 µl RNA Spike Control Oligos (enthalten im FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit) in jedes Well zugegeben. Danach wurde 5 µl Poly(A)-Mastermix (Tab. 16) zu jeder Probe hinzugegeben, gut durchmischt und kurz zentrifugiert. Die 96-Well Platte wurde mit einer Folie bedeckt und 15 min bei 37 °C auf einem Heizblock (Veriti 96-well Thermal Cycler) inkubiert.



Tab. 16: Poly(A)-Mastermix.

Reagenz	Volumen pro miRNA Array (µl)
10X Reaktionspuffer	1,5
25 mM MnCl <sub>2</sub>	1,5
verdünnter ATP Mix (1:500 in 1 mM Tris, pH 8)	1,0
PAP Enzym	1,0
Gesamtvolumen	5

#### 2.2.3.2.3 FlashTag™ Biotin HSR Ligation

Die Platte wurde zentrifugiert und wieder auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 4 µl 5X FlashTag Biotin HSR Ligation Mix sowie 2 µl T4-DNA-Ligase. Die Proben wurden gemischt und die Platte zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation für 30 min bei 25 °C. Die Ligationsreaktion wurde durch Zugabe von 2,5 µl HSR Stop Solution beendet. Durch Pipettieren wurden die Proben gemischt und abzentrifugiert.

#### 2.2.3.2.4 Hybridisierung

Die 20X Eukaryotic Hybridization Controls (*bioB*, *bioC*, *bioD*, *cre* im GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit enthalten) wurden für 5 min auf 65 °C erhitzt. Zu den Proben wurden jeweils 110,5 µl Hybridisierungscocktail-Mastermix (Tab. 17) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 99 °C und eine weitere für 5 min bei 45 °C.

Tab. 17: Hybridisierungscocktail-Mastermix.

Reagenz	Endkonzentration	Volumen pro miRNA Array (µl)
2X Hybridization Mix	1X	66,0
27,5 % Formamid	4 %	19,2
DMSO	9,7 %	12,9
20X Hybridization Controls	1X	6,6
Control Oligo B2, 3 nM	50 pM	2,2
Nukleasefreies Wasser		3,7
Gesamtvolumen		110,5

Abschließend wurden von jeder Probe 130 µl in einen Affymetrix GeneChip Array injiziert. Um den Array beladen zu können, wurde eine Pipettenspitze in ein Septum des Arrays gesteckt. Danach wurde der Array über das andere Septum mit Probenmix befüllt. Beide Septa wurden mit 1/2"-Tough-Spots beklebt, um Evaporation und Undichtigkeit zu verhindern. Dann wurden die Arrays in Trays gestellt, welche dann in den Hybridisierungsöfen geladen wurden. Die Hybridisierung der markierten RNAs dauerte 16 h bei 48 °C und 60 Umdrehungen pro Minute (rpm).

### 2.2.3.2.5 Waschen und Färben der Arrays

Die Arrays wurden nach der Inkubation über Nacht aus dem Hybridisierungssofen genommen, sowie die 1/2“-Tough-Spots entfernt. Mithilfe einer Pipettenspitze wurde der Hybridisierungscocktail aus dem Septum gezogen, während das zweite Septum mit einer weiteren Pipettenspitze belegt war. Danach wurde jeder Array mit 160 µl Array Holding Buffer befüllt. Die Fluidics Station 450 wurde für die Wasch- und Färbeschritte vorbereitet, indem drei Eppendorfgefäße pro Array in die Probenhalterungen eingespannt wurden: ein gelbes Eppendorfgefäß mit 600 µl Stain Cocktail 1, ein Eppendorfgefäß mit 600 µl Stain Cocktail 2 und ein drittes Eppendorfgefäß mit 800 µl Array Holding Buffer. Schließlich wurden die Arrays nach dem Fluidics Station 450 Wasch- und Färbeprotokoll auf der Fluidics Station 450 für 90 min gewaschen und gefärbt (Tab. 18).

**Tab. 18: Wasch- und Färbeprotokoll für die Fluidics Station 450.**

Schritt	Beschreibung
<b>Post Hyb Wash #1</b>	10 Zyklen mit 2 Mischen/Zyklus mit Wash Buffer A bei 30 °C
<b>Post Hyb Wash #2</b>	6 Zyklen mit 15 Mischen/Zyklus mit Wash Buffer B bei 50 °C
<b>1<sup>st</sup> stain</b>	Färben des Arrays für 5 Minuten mit Stain Cocktail 1 bei 35 °C
<b>Post Stain Wash</b>	10 Waschzyklen mit 4 Mischen/Zyklus mit Wash Buffer A bei 30 °C
<b>2<sup>nd</sup> Stain</b>	Färben des Array für 5 Minuten mit Stain Cocktail 2 bei 35 °C
<b>3<sup>rd</sup> Stain</b>	Färben des Array für 5 Minuten mit Stain Cocktail 1 bei 35 °C
<b>Final Wash</b>	15 Zyklen mit 4 Mischen/Zyklus mit Wash Buffer A bei 35 °C
<b>Array Holding Buffer</b>	Befüllung des Array mit Array Holding Buffer

Nach dem Wasch- und Färbevorgang wurden die Septa der Arrays wieder mit Tough-Spots beklebt und auf Luftblasen kontrolliert. Der GeneChip® Scanner 7G wurde zum Scannen der Arrays verwendet. Der Scanvorgang dauerte 1 h bei Standardeinstellungen. Am Ende wurden aus den gemessenen Intensitäten durch die Affymetrix® GeneChip Command Console (AGCC) cel-Files erstellt.

### 2.2.3.2.6 Analyse der Microarraydaten

Mithilfe der TAC Software 4.0 von Affymetrix® wurden die Microarray Daten analysiert (Tab. 12). Die Qualitätskontrolle der Daten beinhaltete eine Normalisierung mit “robust multi-array average“ (RMA) und “detection above background“ (DABG). Die relativen Expressionsunterschiede zur PBS/BSA 0,1 % Behandlung wurden mit folgender Formel berechnet:

$$n\text{-fache Veränderung (im linearen Raum)} = 2^{(\text{Bedingung 1 Bi-weight Avg Signal (log2)} - \text{Bedingung 2 Bi-weight Avg Signal (log2)})}$$

**Bedingung 1:** IL-6- bzw. IL-1β-behandelte HepaRG-Zellen

**Bedingung 2:** PBS/BSA 0,1 %-behandelte HepaRG-Zellen

### 2.2.3.3 Genexpressionsanalyse

In hepatischen Zellmodellen wurden die Effekte von Cytokinen bzw. miRNA-Mimics auf die Genexpression von bestimmten ADME-Genen untersucht. Die Quantifizierung erfolgte durch qRT-PCR mit vordesignierten TaqMan®-Primern auf dem 7900HT Fast Real-Time PCR System bzw. Biomark® HD System (Tab. 4). Die qRT-PCR wurde bei der Untersuchung der Expression von wenigen Genen auf dem 7900HT Fast Real-Time PCR System durchgeführt, während bei einer höheren Anzahl an Genen (>6) die mikrofluiden Arrays auf dem Biomark® HD System zum Einsatz kamen. Bei dem Biomark® HD System handelt es sich um eine Hochdurchsatztechnologie, welche *Intergrated Fluidic Circuits* (IFCs) auf Arraybasis besitzt und mit der konventionellen qRT-PCR vergleichbar ist (Spurgeon et al. 2008).

#### 2.2.3.3.1 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription der RNA in die *complementary DNA* (cDNA) wurde das TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit verwendet (Tab. 3). Dafür wurden 150 (Biomark) bzw. 500 (7900HT) ng Gesamt-RNA pro Probe eingesetzt. Ein Mastermix wurde verwendet (Tab. 19). Die cDNA-Synthese wurde in einem Veriti Thermocycler (für 386-Well Platten) mit einem definierten Temperaturprotokoll durchgeführt (Tab. 20).

Tab. 19: Mastermix für die cDNA-Synthese.

Reagenz	Endkonzentration	Volumen pro Ansatz (µl)
10X TaqMan® RT Buffer	1X	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5,5 mM	2,2
dNTP-Mix	500 µM jeweils	2
random hexamers	2,5 µM	0,5
RNase Inhibitor	0,4 U/µl	0,2
Multiscribe Reverse Transkriptase (RT) (50 U/µl)	1,25 U/µl	0,25
RNA	150 bzw. 500 ng	3,85
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>10</b>

Tab. 20: Temperaturprotokoll für die cDNA-Synthese.

Schritt	Temperatur	Zeit
Primeranlagerung	25 °C	10 min
Synthese (Temperaturoptimum der RT)	45 °C	30 min
RT Inaktivierung	95 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

### 2.2.3.3.2 Präamplifizierung der cDNA

Aufgrund der geringen Volumina, die bei der qRT-PCR auf dem Biomark® HD System eingesetzt werden, wird eine spezifische Targetvervielfältigung empfohlen, um die Konzentration von sehr gering exprimierten Targets zu erhöhen. Durch das Poolen der Genexpressionsassays können bis zu 100 Targets parallel präamplifiziert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass nur Targets, die von Interesse sind, vervielfältigt werden. Die verwendeten TaqMan®-Assays wurden gepoolt (20X, 1 µl pro Assay) und mit DNA-Suspensionspuffer verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,2X zu erhalten (Pooled Assay Mix). Dieser Mix wurde mit PreAmp Mastermix und cDNA gemischt (Tab. 21). Die Präamplifizierung wurde auf einem Veriti Thermocycler (für 386-Well Platten) durchgeführt (Tab. 22). Danach wurden die Proben 1:3 mit DNA-Suspensionspuffer verdünnt.

Tab. 21: Reagenzien für die Präamplifizierung der cDNA.

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µl)
2X TaqMan® PreAmp Mastermix	2,5
0,2X Pooled Assay Mix	1,25
cDNA	1,25
Gesamtvolumen	5

Tab. 22: Temperaturprotokoll für die Präamplifizierung der cDNA.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	14
Primeranlagerung/Elongation	60 °C	4 min	
Kühlung	4 °C	∞	-

### 2.2.3.3.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mittels qRT-PCR. Dazu wurden spezifische TaqMan®-Assays für das jeweilige Gen verwendet (Tab. 6). Ein TaqMan®-Assay besteht aus einem nicht-markierten Primerpaar und einer TaqMan®-Sonde (Reporter). Die Sonde ist mit FAM™- oder VIC®-Farbstoff am 5'-Ende markiert und besitzt am 3'-Ende den sogenannten *minor groove binder* (MGB) und den nicht-fluoreszierenden Quencher (NFQ) (Holland et al. 1991). Die Fluoreszenz des Reporters wird durch die Nähe des Quenchers aufgrund des Fluoreszenz-Resonanzenergietransfers unterdrückt. Während der Primeranlagerung und Verlängerung der DNA bindet die TaqMan®-Sonde an ihre Target-Sequenz. Die Taq-Polymerase synthetisiert einen

## 2. Material und Methoden

komplementären DNA-Strang, bis sie die Sonde erreicht. Dann wird die Sonde durch die 5'-Nukleaseaktivität der Polymerase degradiert, was zu einer räumlichen Separation des Fluoreszenzfarbstoffes vom Quencher und somit zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Dieses messbare Fluoreszenzsignal ist proportional zu der Anzahl an degradierten Sondenmolekülen, welche sich exponentiell mit der Anzahl an PCR-Zyklen erhöhen. Eine PCR-Reaktion besteht aus einer exponentiellen, linearen und einer Plateauphase. Zur Quantifizierung wird die exponentielle Phase verwendet, um eine exakte Analyse zu ermöglichen. Der sogenannte *Threshold* stellt die Nachweisgrenze dar, bei der die Intensität der Fluoreszenz über die Hintergrundintensität steigt. Der  $C_t$  Wert wird durch den PCR-Zyklus gebildet, bei dem die Probe den Threshold erreicht (Applied Biosystems 2010).

Zur Probenvorbereitung für das 7900HT Fast Real-Time PCR System wurde die cDNA 1:1 mit H<sub>2</sub>O in einer 384-Well Platte verdünnt und 10 µl Mastermix pro Probe hinzugefügt (Tab. 23). Die Platte wurde mit Folie verschlossen, gevortext und zentrifugiert.

**Tab. 23: Mastermix für qRT-PCR auf dem 7900HT Fast Real-Time PCR System.**

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µl)
2X TaqMan® Universal PCR Mastermix	6,25
20X TaqMan® Gene Expression Assay	0,625
H <sub>2</sub> O	3,125
Probe (1:1 cDNA)	2,5
Gesamtvolumen	12,5

Anschließend erfolgte der qRT-PCR-Lauf in Duplikaten auf dem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Tab. 24). Die Analyse der Daten erfolgte mittels SDS Software v2.4 und die Genexpression wurde analog wie beim Biomark HD System ausgewertet (siehe unten).

**Tab. 24: Temperaturprotokoll für das 7900HT Fast Real-Time PCR System.**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Primeranlagerung/Elongation	60 °C	1 min	
Kühlung	4 °C	∞	-

Bei einem qRT-PCR-Lauf auf dem Biomark® HD System wurden die Assays und Proben zuerst mit zwei verschiedenen *loading reagents* in zwei 96-Well Platten

## 2. Material und Methoden

vorbereitet, bevor sie auf den 48.48 Dynamic Array™ IFC geladen wurden (Tab. 25 und Tab. 26). Die Platten wurden mit Folie verschlossen, gevortext und zentrifugiert.

**Tab. 25: Vorbereitung der TaqMan®-Assays für den 48.48 Dynamic Array™ IFC.**

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µl)
20X TaqMan® Gene Expression Assay	2,5
2X Assay Loading Reagent	2,5
Gesamtvolumen	5

**Tab. 26: Probenvorbereitung für den 48.48 Dynamic Array™ IFC.**

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µl)
2X TaqMan® Universal PCR Mastermix	2,5
20X GE Sample Loading Reagent	0,25
cDNA	2,25
Gesamtvolumen	5

Eine Kontrollflüssigkeit wurde mit einer Spritze in beide Akkumulatoren auf dem 48.48 Dynamic Array™ IFC injiziert (Tab. 5). Danach erfolgte das Priming des Arrays im IFC Controller MX für 15 min. Anschließend wurde der Array mit 5 µl pro Assay und 5 µl pro Probe beladen (48 Assays vs. 48 Proben). Dann wurde der Array in den IFC Controller MX für 50 min geladen, um die Assays und Proben auf dem Array zu verteilen. Am Ende erfolgte der qRT-PCR Lauf für 2 h auf dem Biomark® HD System nach dem GE 48x48 Standard v1 Protokoll (Tab. 27).

**Tab. 27: Temperaturprotokoll für das BioMark HD system mit 48.48 Dynamic Array™ IFC (GE 48x48 Standard v1).**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	40
Primeranlagerung/Elongation	60 °C	1 min	
Kühlung	4 °C	∞	-

Die generierten Daten wurden mit der Fluidigm Real-Time PCR Analysis Software ausgewertet. Als Normalisierungsgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches stabil in HepaRG-Zellen exprimiert ist, verwendet. Die Thresholds wurden automatisch für jeden Assay durch die Software festgelegt. Die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde zur Quantifizierung der Genexpression verwendet (Livak und Schmittgen 2001). Zellen, welche mit siCTR-Kontrolle behandelt wurden, dienten als Kalibrator im Vergleich zu den Mimic-Behandlungen. N-fache Änderungen der

Genexpression zwischen Kontroll- und Mimic Behandlung wurden berechnet (siehe unten).

$$C_t(\text{miRNA-Mimic}) - C_t(\text{GAPDH}) = \Delta C_t(\text{miRNA-Mimic})$$

$$\Delta C_t(\text{miRNA-Mimic}) - \Delta C_t(\text{siCTR}) = \Delta\Delta C_t(\text{miRNA-Mimic})$$

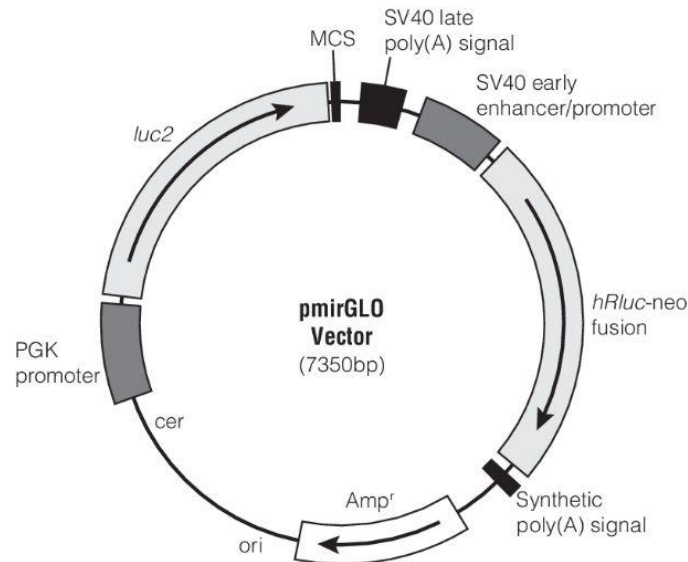
$$\text{n-fache Expression} = 2^{(-\Delta\Delta C_t(\text{miRNA-Mimic}))}$$

### 2.2.3.4 Luciferase-Reportergen-Konstrukte

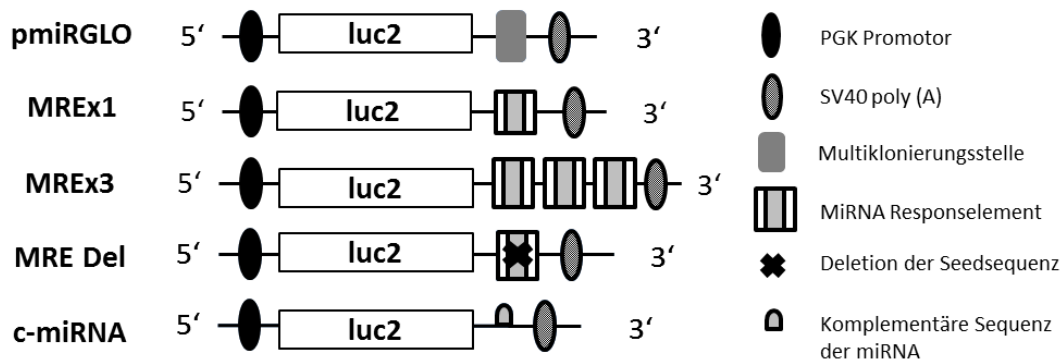
#### 2.2.3.4.1 Erstellung der Luciferase-Reportergen-Konstrukte

Zur Identifizierung von funktionalen Bindestellen für miRNAs in 3'-UTRs von ADME-Genen wurden verschiedene Luciferase-Reportergen-Konstrukte mit *in silico* vorhergesagten Bindestellen in unterschiedlichen Längen, Kopienzahl und deletierter Version konstruiert. Die DNA-Fragmente wurden von der Firma GenScript (Leiden, Niederlande) synthetisiert. Außerdem erfolgte durch GenScript die Klonierung der DNA-Fragmente in den „Dual-Luciferase miRNA-Target Expression Vector“ pmirGLO hinter das Firefly-Luciferasegen (*luc2*) innerhalb der Multi-Klonierungsstelle zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme PmeI und XbaI (siehe Abb. 5, Abb. 6 und Tab. 11). Dabei wurden die *in silico* Vorhersagen von TargetScan, einem Target-Vorhersagealgorithmus, verwendet (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016; Kugler et al. 2019). Es wurden nur Bindestellen der miRNA-Kandidaten in ADME-Genen (siehe Tab. 39), die ein Context++ Score Perzentil > 50 zeigten und im jeweiligen leberexprimierten Haupttranskript vorhanden waren, verwendet. Die Länge der 3'-UTR Fragmente wurde so gewählt, dass die vorhergesagte Bindestelle ungefähr in der Mitte lag (siehe Tab. 28 und Beispiel). Das weitere Vorgehen für die anderen Konstrukte ist in Tab. 28 dargestellt. Als Positivkontrollen wurden die komplementären Sequenzen der jeweiligen miRNA eingesetzt. Für dieses Vorgehen dienten mehrere Publikationen als Orientierung (Wang und Burke 2013; Oda et al. 2014).

## 2. Material und Methoden



**Abb. 5: Plasmidkarte des Dual-Luciferase miRNA-Target Expression Vektor pmirGLO.** Der Vektor kodiert für die Firefly-Luciferase (*luc2*) und Renilla-Luciferase (*hRluc-neo fusion*) und besitzt eine Multi-Klonierungsstelle (MCS), verschiedene Promotoren (PGK und *SV40 early enhancer*), ein Poly(A)-Signal, Replikationsursprung (*ori*) und sowie ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin.



**Abb. 6: Aufbau der Luciferase-Reporter-Konstrukte.** Als Grundvektor wurde der pmirGLO benutzt. Für jede untersuchte Bindestelle innerhalb der ADME-Gene wurden jeweils drei Konstrukte erstellt: MREx1 (vorhergesagte miRNA-Bindestelle), MREx3 (dreifache Wiederholung der miRNA-Bindestelle) und MRE Del (ohne Seed-Sequenz). Für jede untersuchte miRNA enthielten die Konstrukte als Positivkontrolle jeweils die komplementäre Sequenz der miRNA (c-miRNA). Der Leervektor pmirGLO ohne eingefügtes Fragment diente als Vergleich (Modifiziert aus Kugler et al. (2019)).



Tab. 28: Übersicht über die Erstellung der Luciferase-Reporterger-Konstrukte.

Bezeichnung	Inhalt	Gesamt-fragmentlänge
<b>Wildtyp Bindestelle (MREx1)</b>	62 bp + <u>MRE</u> + <b>Seed</b> + 50 bp	ca. 122 bp
<b>Wildtyp mit 3-facher Bindestelle (MREx3):</b>	CGG + 12 bp + <u>MRE</u> + <b>Seed</b> GTG + 12 bp <u>MRE</u> + <b>Seed</b> GTG + 12 bp <u>MRE</u> + <b>Seed</b> GTG = 114 bp	ca. 114 bp
<b>Deletion der Seed-Sequenz (MRE Del):</b>	MREx1 – <b>Seed</b> = 50 bp + <u>MRE</u> + 50 bp	ca. 115 bp
<b>Komplementäre miRNA Sequenz (c-miRNA)</b>	CTAGA + komplementäre Sequenz + T	ca. 27-29 bp

**Beispiel: Vorhergesagte Bindestelle von miR-130b-3p in 3'-UTR von CYP2B6**

**1. CYP2B6-miR-130b-MREx1**

CCTCCACCCCCGGGGATCAAGCAACTCTCCTGCCTCAGCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGC  
A**TGCACTA**ACCACGCTTGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACTGTG

**2. CYP2B6-miR-130b-MREx3**

CGGCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGC**TGCACTA**GTGCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAG  
GC**TGCACTA**GTGCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGC**TGCACTA**GTG

**3. CYP2B6-miR-130b-MRE Del**

CCTCCACCCCCGGGGATCAAGCAACTCTCCTGCCTCAGCCTCCCTAGTAGCTGGGATTACAGGC  
ACCACGCTTGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACTGTG

**4. Komplementäre Sequenz von miR-130b-3p (c-miR-130b-3p)**

CTAGATGCCCTTTCATCATTGCACTGT

**Hybridisierung mit der Seed-Sequenz in der miRNA (7-8 bp)**

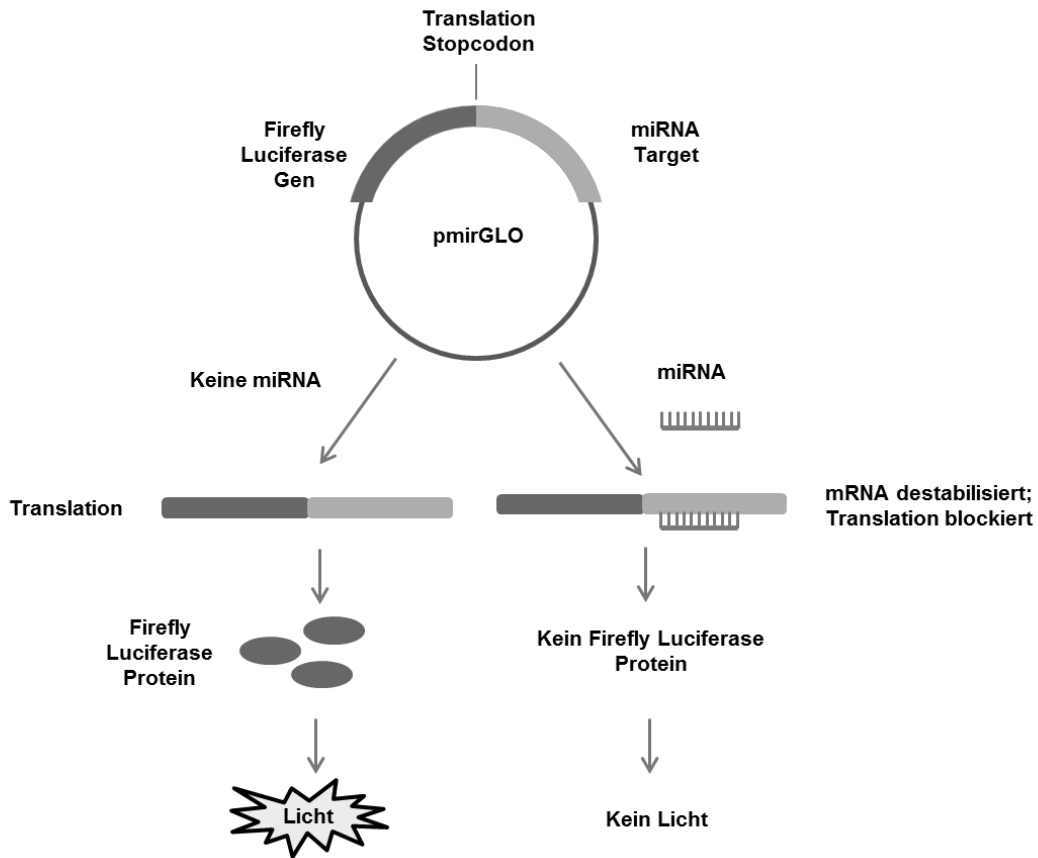
Von TargetScan vorhergesagtes MRE (15 bp)

**2.2.3.4.2 Kotransfektion der Luciferase-Reporterger-Konstrukte mit miRNA-Mimics in Huh7-Zellen**

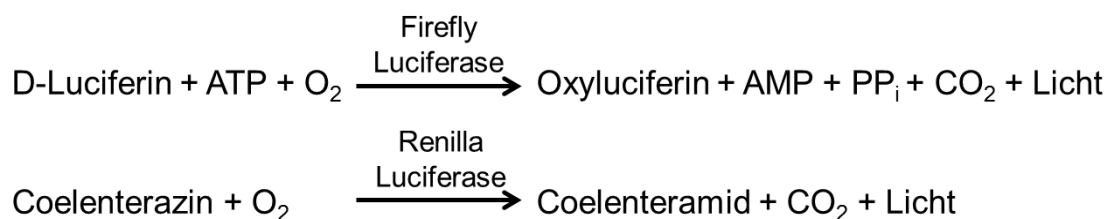
Huh7-Zellen wurden mit verschiedenen Luciferase-Reporterger-Konstrukten und miRNA-Mimics bzw. siCTR (siehe Tab. 11) kotransfiziert. Dabei wurden 2 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat mit 100 ng Plasmid-DNA und 100 nM miRNA-Mimic bzw. siCTR mit Viomer®RED-Transfektionsreagenz transfiziert. Jeder Ansatz wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Zellyse fand 48 h nach der Transfektion mit 25 µl 1X Passive Lysis Buffer (PLB) pro Well für 15 min bei RT auf einem Schüttler statt. Danach wurden die Lysate resuspendiert und die Platten mit Parafilm umwickelt und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### **2.2.3.4.3 Aktivitätsmessung der Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte**

Die Platten aus 2.2.3.4.2 wurden auf Eis aufgetaut. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System verwendet. Bei voller Funktionalität setzen beide Luciferasen-Substrate um, dabei entsteht Lumineszenz (Abb. 8). Durch die Bindung der transfizierten miRNA an die im Konstrukt enthaltenen 3'-UTR wird eine Abnahme der Firefly-Luciferase-Menge innerhalb der Zelle erwartet, was zu einer reduzierten Lumineszenz führt (siehe Abb. 7). Dadurch kann im Vergleich zur Kontrollbehandlung eine direkte Bindung an die Targetsequenz nachgewiesen werden. Die *in silico* vorhergesagte Bindestelle ist somit funktional. Die Aktivität der Renilla-Luciferase, welche bei gleicher Transfektionseffizienz in allen Zellen gleich hoch sein sollte, wurde zur Normierung der Firefly-Luciferase-Aktivität verwendet. Die resuspendierten Lysate (5 µl) wurden in einer weißen OptiPlate™-96 zur Lumineszenzmessung mit 20 µl 1 x PLB pro Well verdünnt. Anschließend wurden 15 µl Luciferase Assay Reagenz II pro Well hinzugefügt und die Lumineszenz der Firefly-Luciferase für 10 s pro Well mit dem EnSpire® Plattenleser gemessen. Danach wurden ebenfalls 15 µl Stop and Glo Reagenz pro Well hinzugefügt, um die Aktivität der Firefly-Luciferase zu stoppen und Substrat für die Renilla-Luciferase zur Verfügung zu stellen. Dadurch wurde die Lumineszenz der Renilla-Luciferase für 10 s pro Well im Enspire® Plattenleser gemessen werden. Pro Ansatz wurde die Messung in Triplikaten ausgeführt.



**Abb. 7: Schematischer Ablauf des Luciferase-Reporter-Assays.** Das Plasmid mit der enthaltenen miRNA-Bindestelle wird in der Zelle abgelesen und das Luciferasegen (Firefly) in mRNA transkribiert und dann in Protein translatiert. Dabei entsteht die Firefly-Luciferase mit der jeweiligen Bindestelle in der 3'-UTR. Ist die Firefly-Luciferase nicht in ihrer Aktivität eingeschränkt, kann sie ihr Substrat umsetzen, bei diesem Vorgang entsteht Lumineszenz. Bindet eine miRNA an die Bindestelle, wird die Translation des Luciferasegens verhindert und es entsteht kein bzw. weniger Protein. Somit ist die Luciferaseaktivität eingeschränkt und es wird kein Substrat umgesetzt. Dies führt zu einer geringeren Lumineszenz.



**Abb. 8: Lumineszenzreaktionen der Firefly- und Renilla-Luciferasen.** Luciferin bzw. Coelenterazin werden unter ATP- und Sauerstoffverbrauch zu Oxyluciferin bzw. Coelenteramid umgesetzt, dabei entsteht Licht bzw. Lumineszenz und  $\text{CO}_2$ .

### 2.2.4 In silico Methoden

#### 2.2.4.1 Vorhersage von Targetgenen

Die Suche nach miRNA-Bindestellen in ADME-Genen war mithilfe der TargetScan Datenbank v7.0 (<http://targetscan.org>) in der Masterarbeit erfolgt (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016; Kugler et al. 2019). Die Datenbank verwendet dafür das sogenannte

## 2. Material und Methoden

Context++ Modell, um die Vorhersagen klassifizieren zu können. Dabei werden der Seed-Typ und weitere 14 Eigenschaften von Bindestellen berücksichtigt (Agarwal et al. 2015). Für die Vorhersagen waren die 3'-UTRs von 35 ADME-Genen der sogenannten "Core List" (entnommen von pharmaadme.org, aufgerufen am 15.03.2018), ergänzt durch RXRA, POR und UGT1A3, berücksichtigt worden. Diese Liste war gewählt worden, da sie alle wichtigen Phase I-, Phase II-Enzyme und Transporter beinhaltet. Einige Transkriptionsfaktoren wie *NR1I2* und *NR1I3* wurden in der Doktorarbeit ergänzt (Tab. 29). Für diese Gene waren Vorhersagen für 2 578 miRNAs gemacht worden, die von dem Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array abgedeckt werden. Die Context++ Score Perzentile wurden durch die neueste Version von TargetScan v7.2 aktualisiert (März 2018).

**Tab. 29: Berücksichtigte ADME-Gene für die Target-Vorhersagen.** Die "Core List" wurde ausgewählt und mit weiteren Faktoren ergänzt (entnommen von pharmaadme.org, aufgerufen am 15.03.2018).

Gen-symbol	Genname	Klasse
<b>ABCB1</b>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	Transporter
<b>ABCC2</b>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	Transporter
<b>ABCG2</b>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	Transporter
<b>CYP1A1</b>	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	Phase I
<b>CYP1A2</b>	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	Phase I
<b>CYP2A6</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	Phase I
<b>CYP2B6</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	Phase I
<b>CYP2C19</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19	Phase I
<b>CYP2C8</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	Phase I
<b>CYP2C9</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9	Phase I
<b>CYP2D6</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily D, polypeptide 6	Phase I
<b>CYP2E1</b>	cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	Phase I
<b>CYP3A4</b>	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	Phase I
<b>CYP3A5</b>	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 5	Phase I
<b>DPYD</b>	dihydropyrimidine dehydrogenase	Phase I
<b>GSTM1</b>	glutathione S-transferase M1	Phase II
<b>GSTP1</b>	glutathione S-transferase pi	Phase II
<b>GSTT1</b>	glutathione S-transferase theta 1	Phase II
<b>NAT1</b>	N-acetyltransferase 1 (arylamine N-acetyltransferase)	Phase II
<b>NAT2</b>	N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)	Phase II
<b>NR1I2</b>	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2	Modifier
<b>NR1I3</b>	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 3	Modifier
<b>POR</b>	P450 (cytochrome) oxidoreductase	Modifier
<b>RXRA</b>	retinoid X receptor, alpha	Modifier

## 2. Material und Methoden

<b>SLC15A2</b>	solute carrier family 15 (H <sup>+</sup> /peptide transporter), member 2	Transporter
<b>SLC22A1</b>	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	Transporter
<b>SLC22A2</b>	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	Transporter
<b>SLC22A6</b>	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	Transporter
<b>SLCO1B1</b>	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	Transporter
<b>SLCO1B3</b>	solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	Transporter
<b>SULT1A1</b>	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 1	Phase II
<b>TPMT</b>	thiopurine S-methyltransferase,	Phase II
<b>UGT1A1</b>	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1	Phase II
<b>UGT1A3</b>	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A3	Phase II
<b>UGT2B15</b>	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B15	Phase II
<b>UGT2B17</b>	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B17	Phase II
<b>UGT2B7</b>	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B7	Phase II

### 2.2.5 Biochemische Methoden

#### 2.2.5.1 Proteinlysate

Proteinlysate wurden aus HepaRG-Zellen gewonnen. Dabei wurden die kultivierten Zellen einmal mit 1X PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 1X PLB lysiert und mit der Pipettenspitze abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt (100-200 µl für 24-Well bzw. 12-Well Platte). Im Anschluss wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren. Da Proben für die Detektion von PXR nicht ausreichend mit 1X PLB lysiert waren, wurden die Proben stattdessen mit RIPA-Lysispuffer aufgeschlossen (Tab. 1). Dafür wurde dieser mit 25X Proteinkinase Inhibitor Cocktail versetzt und nach einem PBS-Waschvorgang 50 µl pro Well hinzugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Nachdem sich die Zellen abgelöst hatten, wurden sie in ein Eppendorfgefäß überführt, dabei wurden zwei Wells zu einer Probe vereinigt (24-Well Platte). Danach wurden die Zelllysate mit dem Bioruptor UCD-200 bei 200 W für 4 x 30 s sonifiziert und dann für 15 min bei 14 000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und wie alle Proben bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Für 2D-Western Blots wurden Zellpellets generiert: Zellen wurden mit 1X PBS gewaschen und nach einer erneuten PBS-Zugabe mit der Pipettenspitze abgekratzt und 4 Wells zu einer Probe vereinigt (24-Well Platte). Die Proben wurden für 5 min bei 1 400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das verbleibende Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bis zum Versand bei -80 °C gelagert.

### **2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinsuspension aus 2.2.5.1 wurde zur Proteinbestimmung genutzt. Dafür wurde das Pierce® BCA Protein Assay Kit nach Anweisung des Herstellers verwendet. Diese Methode beruht auf der sogenannten Biuret-Reaktion, bei der Kupfer durch Peptidbindungen der Proteine in einem alkalischen Milieu reduziert wird. Reduziertes Kupfer kann durch Bicinchoninsäure detektiert und photometrisch gemessen werden. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurden die Proben auf Eis aufgetaut und für 2 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Es wurde eine Standardreihe aus BSA (125 bis 2 000 µg/ml) angesetzt und mitgeführt. Als Probenvolumen wurden 10 µl eingesetzt und in Duplikate gemessen. Die Absorption des dunkel-violetten Farbkomplexes wurde bei 562 nm mit dem EnSpire® Plattenleser ermittelt. Die Proteinlysate wurden entsprechend ihrer Konzentration mit milliQ-H<sub>2</sub>O auf die gleiche Konzentration (550 – 1000 mg/ml) eingestellt und mit 5X Laemmli-Probenpuffer versetzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Lysate für 5 min bei 95 °C erhitzt, bevor sie in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt wurden.

### **2.2.5.3 Behandlung mit PNGase F**

Zur Untersuchung von post-translationalen Modifikationen wie Glykosylierung bei Proteinen wurden die Proben mit PNGase F, eine Glykosidase, behandelt. Dabei wurden 11 µg Protein eingesetzt und die Behandlung unter denaturierenden Bedingungen laut Hersteller durchgeführt (Inkubation mit PNGase F bei 37 °C für 1 h) und am Ende mit 5X Laemmli-Probenpuffer versetzt. Mit den Proben wurde eine 1D-Gelelektrophorese durchgeführt im Vergleich zu unbehandelten Proben.

### **2.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Proteinlysate wurden sowohl in eine Dimension (1D, Molekulargewicht) als auch in zwei Dimensionen (2D, Ladung und Molekulargewicht) aufgetrennt.

#### **2.2.5.4.1 1D-Gele**

Die Proteine wurden aufgrund ihrer Molekülmasse (Größe) durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine erhalten eine negative Ladung durch Natriumdodecylsulfat (SDS) und lassen sich relativ zu ihrer Masse im elektrischen Feld auftrennen. Die Proben (10-20 µg Protein in 18 µl pro Tasche) und die Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder (als Marker zur Abschätzung des Molekulargewichtes) wurden auf das Sammelgel aufgetragen. Um die Proben im Gel zu sammeln, wurde die Gelelektrophorese für 30 min bei 100 V in einer Mini-PROTEAN Elektrophoresekammer durchgeführt. Danach begann die Auftrennung der

## 2. Material und Methoden

Proteine im Trenngel bei 150 V für 1,5 h. Die Substanzen, die zum Gießen der Gele verwendet wurden, sind in Tab. 2 und Tab. 30 dargestellt.

**Tab. 30: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE (1D).**

Reagenz	Trenngel (10 %) (ml)	Sammelgel (4 %) (ml)
H <sub>2</sub> O <sub>millipore</sub>	3	1,53
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,875	-
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	0,625
30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	2,5	0,34
10% SDS	0,075	0,025
TEMED	0,0075	0,0025
10% APS	0,075	0,025
Gesamt	7,53	2,55

### 2.2.5.4.2 2D-Gele

Die 2D-Gelelektrophorese mit anschließendem Western Blot wurde am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin von Christine Meckert durchgeführt. Zellpellets von cytokinbehandelten HepaRG-Zellen wurden am IKP in Stuttgart generiert (siehe 2.2.5.1) und auf Trockeneis nach Berlin verschickt. Die Lyse der Zellpellets erfolgte mit einem harnstoffhaltigen Puffer (BfR-Lysispuffer) (Tab. 2). Dabei wurden 200 µl Lysispuffer auf das gefrorene Zellpellet gegeben, vermischt und sonifiziert. Die Proben wurden 30 min geschüttelt und danach erfolgte die Ultrazentrifugation für 1 h bei 40 000 rpm. Die Auftrennung in zwei Dimensionen erfolgte in zwei Schritten: Isoelektrische Fokussierung (IEF) und eine nachfolgende denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Gelstreifen für die IEF bestehen aus immobilisierten pH-Gradienten (im pH-Bereich 3-10) in einer Polyacrylamidmatrix. Die Proteine wandern im elektrischen Feld dann bis zu ihrem sogenannten isoelektrischen Punkt, an dem sich die positiven und negativen Ladungen der Proteine ausgleichen. Danach erfolgt die Auftrennung nach Größe (Molekulargewicht) mittels SDS-PAGE. Für die IEF wurden 150 µg Protein in 125 µl Rehydrationspuffer (BfR-Lysispuffer ohne Spermin, Pharmalyte von 2 % auf 0,5 % reduziert) eingesetzt. Die Proben wurden in Inkubationsrinnen aufgetragen und mit ServaBlue IPG Streifen 3-10 NL/7 cm vorsichtig bedeckt (Gelseite nach unten). Nach 5 min wurden die Inkubationsrinnen mit CoverFluid beschichtet und die Proben über Nacht rehydratisiert. Am nächsten Tag wurden die Gelstreifen in ein Ettan IPGphor3 IEF System transferiert. Dabei wurde die Gelseite nach oben platziert und die Enden der Streifen mit Filterpapieren bedeckt, um Kontakt zu den Elektroden zu gewährleisten. Die Streifen wurden komplett mit CoverFluid überschichtet, um eine Austrocknung zu vermeiden. Danach erfolgte die

## 2. Material und Methoden

IEF mit dem Programm, das in Tab. 31 dargestellt ist. Anschließend wurden die Streifen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

**Tab. 31: Protokoll für die isoelektrische Fokussierung IEF Nano GE 7 cm.**

Zeit	Spannung	
1 h	300 V	konstant
1 h	1000 V	Gradient
2 h	5000 V	Gradient
1,5 h	5000 V	konstant

Vor der Gelelektrophorese erfolgte eine Äquilibration mit Dithiothreitol (DTT), um Disulfidbrücken zu reduzieren, die dann mit Iodaccedamid (IAA) alkyliert werden und durch SDS eine negative Ladung erhalten. Dafür wurde der Äquilibrationpuffer mit 1 % DTT versetzt und die Streifen für 15 min damit inkubiert. Danach wurde dieser abgegossen und neuer Äquilibrationpuffer mit 4 % IAA hinzugefügt und weitere 15 min auf dem Schüttler inkubiert.

Die zweite Auftrennung nach Größe erfolgte durch eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit 12%igen Trenngelen (siehe Tab. 32). Dabei wurde der Gelstreifen horizontal oberhalb des Trenngels platziert, damit diese in Kontakt waren und mit 0,5 % Agarose (mit 0,075 % Bromphenolblau) überschichtet. Der Gellauf erfolgte bei 15 mA/Gel, bis die Bromphenolblaulinie den unteren Rand der Glaskassette erreicht hat.

**Tab. 32: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (2D).**

Reagenz	Trenngel (12 %) (ml)
milliQ-H <sub>2</sub> O	4,12
Trenngelpuffer	3
30% Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	4,8
TEMED	0,015
10% APS	0,050
Gesamt	11,99

### 2.2.5.5 Western Blot

#### 2.2.5.5.1 1D-Western Blot

Die aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurden "semi-dry" auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür wurden drei Filterpapiere, eine Membran, das Gel und weitere drei Filterpapiere in eine Fast-Blotting Kammer (Fastblot B44) gelegt. Alle Komponenten wurden davor in 1X Transferpuffer getränkt (Tab. 2). Der Transfer auf die Membran erfolgte für 20 min bei 80 mA (ein Gel) bzw. 160 mA (zwei Gele). Danach wurde die Membran mit Ponceaurot gefärbt, um zu überprüfen, ob die



Proteine gleichmäßig auf die Membran transferiert wurden. Die Membran wurde mit 1X TBST entfärbt und für 1 h bei RT in 5%iger Magermilch (MM)/TBST Lösung geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper (AK) (siehe Tab. 8), welche abhängig vom AK 1 h ( $\beta$ -Actin) bzw. 3 h (CYP2C9) betrug oder über Nacht (PXR und RXR $\alpha$ ) erfolgte. Nach diesem Schritt wurde überflüssiger AK mit 1X TBST 2 x kurz und dann für 2 x 10 min abgewaschen, bevor die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten (IRDye) Sekundär-AK (1: 10 000 verdünnt in 1%iger MM/TBST, siehe Tab. 8) für 30 min im Dunklen erfolgte. Danach schloss sich ein weiterer Waschschrift mit 1X TBST (siehe oben) an. Die Blots wurden mit dem Odyssey CLx Infrared Imaging System und Image Software analysiert. Die untersuchten Proteine wurden auf die Proteinexpression von  $\beta$ -Actin normalisiert und relativ zur Kontrolle ausgewertet. Der PXR-Antikörper wurde mithilfe *in vitro* transkribierten/translatierten PXR-Proteins validiert. Dieses Protein war mittels „TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System“ von Promega unter Verwendung des Expressionsplasmids pcDhuPXR generiert worden, wie in Geick et al. (2001) beschrieben, und freundlicherweise von Oliver Burk zur Verfügung gestellt worden.

### 2.2.5.5.2 2D-Western Blot

Die 2D-aufgetrennten Proteine aus der SDS-PAGE wurden "semi-dry" auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer wurde dabei analog zu den 1D-Gelen durchgeführt, er erfolgte aber für 1 h bei 230 mA (vier Gele) im TE 77 PWR Blotting Gerät. Um den Transfer zu überprüfen, wurde auch eine Ponceau-Färbung durchgeführt. Die Membran wurde für 1,5 h mit 5%iger Magermilch/TBST geblockt und danach 3 x 5 min mit 1X TBST gewaschen. Der Primär-Antikörper (anti-RXR $\alpha$ , Tab. 8) wurde 1:500 in 5%iger MM/TBST verdünnt und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 10 min mit TBST gewaschen. Der peroxidasegekoppelte Sekundär-AK (anti-Maus, aus Schaf, Tab. 8) wurde 1:2 000 eingesetzt und für 1 h inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1X TBST (siehe oben). Zur Antikörper-Detektion wurde das SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat verwendet (1:1), 5 min mit der Membran inkubiert und dann im Molecular Imager® VersaDoc™ MP 4000 System visualisiert.

## 2.2.6 Analytische Methoden

### 2.2.6.1 Aktivitätsmessungen der Cytochrom-P450-Enzyme mit einem auf Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie basierenden Substrat-Cocktail-Assay in Zellen

Um die Enzymaktivität der CYPs 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4, die hauptsächlich am Arzneistoffmetabolismus in der Leber beteiligt sind, zu messen, war bereits ein CYP-Substrat-Cocktail-Assay etabliert worden (Feidt et al. 2010). Dabei wurde ein spezieller Substratmix, bestehend aus sieben Substraten, in Medium verdünnt auf die Zellen für 3 h bei 37°C gegeben (siehe Tab. 33). Auf Chlorzoxazon, ein Modellsubstrat für CYP2E1, wurde verzichtet, da in HepaRG-Zellen eine Aktivität kaum messbar ist. Danach wurde der Überstand mit 20 % (v/v) Ameisensäure (250 mM) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Danach wurde die Entstehung der jeweiligen Metabolite im Mediumüberstand mittels Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie (LC-MS/MS) gemessen.

**Tab. 33: Substrate des CYP-Cocktail-Assays bei Zellen.**

Enzym	Substrat	Lösungsmittel	Mol. Gewicht (g/mol)	Stockkon. (mM)	Endkonz. (µM)
<b>CYP1A2</b>	Phenacetin	DMSO	179	100	50
<b>CYP2B6</b>	Bupropion	H <sub>2</sub> O	256	50	25
<b>CYP2C8</b>	Amodiaquin	H <sub>2</sub> O	465	10	5
<b>CYP2C9</b>	Tolbutamid	DMSO	270	100	100
<b>CYP2C19</b>	S-Mephentoin	ACN	218	100	100
<b>CYP2D6</b>	Propafenon	MeOH	378	10	5
<b>CYP3A4</b>	Atorvastatin	50% ACN	559	5	35

Zur Quantifizierung der Metabolitenbildung in den Mediumüberständen wurden Standardreihen der Metabolite und Qualitätskontrollen in Medium verdünnt vorbereitet (5 µl Standard, 35 µl Medium, 10 µl 250 mM Ameisensäure) (siehe Tab. 34). Sowohl die Standards als auch die Proben (50 µl) wurden in 96-Well Platten pipettiert und jeweils mit 10 µl internem Standard (Mix aus Deuterium-markierten Metaboliten, 5 µM für alle Substanzen, 10 µM für [<sup>2</sup>H<sub>4</sub>] Acetaminophen und [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>] 4-Hydroxymephentoin) gemischt. Danach wurde die Platte abzentrifugiert und durch die Analytik-Abteilung des IKPs auf einem 6460 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, welches an ein 1200 HPLC System gekoppelt war, gemessen. Die gemessene Menge an Metaboliten (pmol/ml) wurde auf die jeweilige Kontrolle normalisiert (PBS/0,1 % BSA bzw. siCTR).

Tab. 34: Stocklösungen der untersuchten Metaboliten und internen Standards zur Messung der CYP-Enzymaktivitäten.

Metabolit	Interner Standard (ISTD)	Stockkonz. Metabolit / ISTD (mM)	MG Metabolit / ISTD (g/mol)	Lösungsmittel Metabolit / ISTD
Acetaminophen	[ <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] Acetaminophen	13,23 / 10	151 / 155	H <sub>2</sub> O
Hydroxybupropion-HCl	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] Hydroxybupropion-HCl	6,84 / 3,39	292 / 295	H <sub>2</sub> O
N-Desethylamodiaquin	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ] N-Desethylamodiaquin	2,75 / 2,94	328 / 333	MeOH
Hydroxytolbutamid	[ <sup>2</sup> H <sub>9</sub> ] Hydroxytolbutamid	3,49 / 3,39	287 / 296	MeOH
4-Hydroxymephenoin	[ <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] 4-Hydroxymephenoin	8,54 / 4,21	234 / 237	MeOH
5-Hydroxypropafenon-HCl	[ <sup>2</sup> H <sub>7</sub> ] 5-Hydroxypropafenon-HCl	5,08 / 2,5	394 / 401	1:1 MeOH: H <sub>2</sub> O
o-Hydroxyatorvastatin	[ <sup>2</sup> H <sub>5</sub> ] o-Hydroxyatorvastatin	1,58 / 1,6	633 / 624	1:1 CAN: H <sub>2</sub> O

### 2.2.6.2 Aktivitätsmessungen der Cytochrom-P450-Enzyme mit einem auf Flüssigchromatographie-Tandem Massenspektrometrie basierenden Substrat-Cocktail-Assay in Lebermikrosomen

Für die Messung von CYP-Enzymaktivitäten in Lebermikrosomen wurde ein bereits vorhandener Lebermikrosomenpool, der aus mehr als 100 humanen Lebern generiert worden war, sowie die gleichen Substrate bzw. Stocklösungen verwendet wie bei Zellinkubationen (Tab. 33). Nur Chlorzoxazon (50 mM in Methanol) als Substrat für CYP2E1 wurde noch zusätzlich verwendet. Der CYP-Substrat-Cocktail wurde für jede Messung in NaPi (0,1 M, pH 7,4) angesetzt (Tab. 35). Ein Volumen von 500 µl reichte für die Messung von 20 Proben in Duplikaten. Alle Reagenzien des NADPH regenerierenden Systems wurden in H<sub>2</sub>O angesetzt (Tab. 36).

Tab. 35: Substrate des CYP-Cocktail-Assays bei Lebermikrosomeninkubation.

Substrat	Endkonz. (µM)	Volumen Stocklösung für 10X Mix (µl)
Phenacetin	50	2,5
Bupropion	25	2,5
Amodiaquin	5	2,5
Tolbutamid	100	5
S-Mephenytoin	100	5
Propafenon	5	2,5
Atorvastatin	35	35
Chlorzoxazon	50	5
NaPi Puffer		440
Gesamtvolumen		500

Tab. 36: Herstellung des NADPH regenerierenden Systems (10X).

Reagenz	Stockkonz. (M)	Endkonz. (mM)	Volumen für 25 Proben in Duplikate (10X)
MgCl <sub>2</sub>	1	50	31,25 µl
Glukose-6-phosphat	1	40	25 µl
NADP <sup>+</sup>	0,1	5	31,25 µl
Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase	25 U/50 µl	40 U/ml	50 µl
NaPi Puffer			487,5 µl
Gesamtvolumen			625 µl

20 µg des Lebermikrosomenpools (1 mg/ml) wurden in NaPi für die Inkubation eingesetzt. Für jede Bedingung wurden zwei Ansätze gemacht. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen an Acriflavin hinzugegeben (2, 10, 15, 30, 50 und 100 µM) und auf ein Volumen von 80 µl aufgefüllt. Danach wurden 10 µl des NADPH regenerierenden System (10X) hinzugegeben und dann für 4 min im Wasserbad (37 °C) vorinkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl CYP-Cocktail-Mix (10X) gestartet (Tab. 36). Nach 20 min wurden die Proben auf Eis gestellt und sofort mit 50 µl Stopplösung (50 % 250 mM Ameisensäure/50 % Acetonitril) versetzt und bei -20°C eingefroren. Zur Messung mittels LC-MS/MS wurden die Proben aufgetaut und 20 µl interner Standard hinzugegeben und gevortext. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13 000 x g. Von jeder Probe wurden 60 µl auf eine 96-Well Platte pipettiert. Die Standards wurden wie folgt angesetzt: 37,5 µl NaPi, 7,5 µl Standard, 5 µl (10 µg) denaturierte Lebermikrosomen, 25 µl 250 mM Ameisensäure und 10 µl interner Standard, gevortext und abzentrifugiert. Die Messungen erfolgten analog zu 2.2.6.1.

### 2.2.7 Statistische Methoden

Statistische Analysen wurden mit Microsoft Excel und GraphPad Prism 5.0 durchgeführt. Student's t Test wurde verwendet, um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen und One-way ANOVA für den Vergleich von mehreren Gruppen mit einer nachfolgenden Bonferroni-Adjustierung. Da die miRNA- und CYP/POR-Daten nicht normal-verteilt waren, wurden Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten  $r_s$  für die Korrelationsanalyse ermittelt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in den Diagrammen dargestellt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant, <0,01 als hoch signifikant, <0,001 als höchst signifikant bezeichnet und mit der betreffenden Anzahl an Sternen (\*) dargestellt (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001).

### 3. Ergebnisse

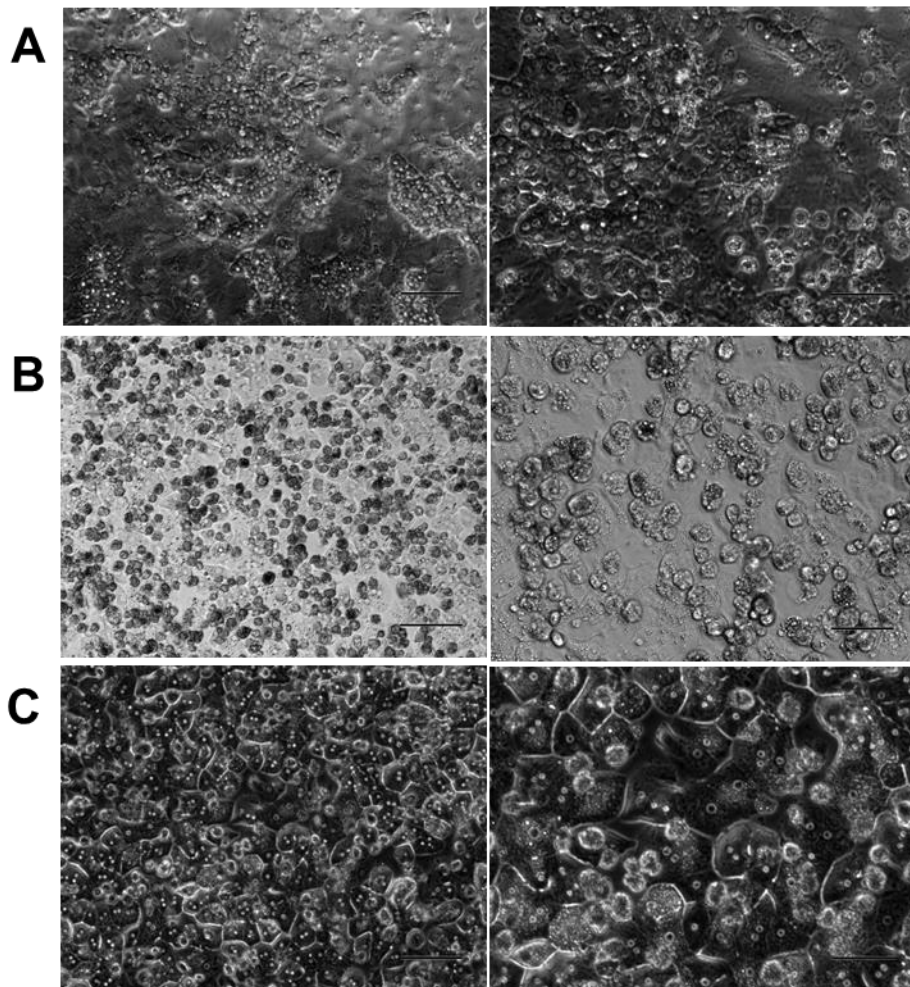
#### 3.1 Evaluation hepatischer Zellmodelle für den Arzneistoffmetabolismus

Heutzutage werden verschiedene hepatische Zellmodelle zur Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus verwendet. Durch die gute Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit von kryokonservierten humanen Hepatozyten sollte ihre Verwendbarkeit im Vergleich zu PHH und HepaRG-Zellen analysiert werden. Der Fokus lag hierbei auf gepoolten Hepatozyten von verschiedenen Donoren, da durch dieses Format die interindividuelle Variabilität begrenzt werden könnte. Dafür sollten die Zellmodelle hinsichtlich ihrer Höhe von CYP-Enzymaktivitäten, ihrer Fähigkeit zur Akut-Phase-Reaktion (durch IL-6-Behandlung), ihrer Induzierbarkeit von CYP-Enzymaktivitäten (durch Rifampicin Behandlung) und ihrer Transfektionseffizienz untersucht und verglichen werden.

##### 3.1.1 Übersicht und Morphologie der hepatischen Zellmodelle

Wie unter 2.2.1.3 beschrieben, wurden HepaRG-Zellen vier Wochen kultiviert und dann zwei weitere Wochen mit DMSO differenziert. Für jedes Experiment wurde ein neues Aliquot aufgetaut. Bei den KHH wurden zwei Aliquots der Charge KCB der Firma Bioreclamation verwendet (gepoolte Hepatozyten aus zehn verschiedenen Donoren) und nach dem Auftauen sofort ausgesät. Für die Beurteilung von PHH wurden zwei verschiedene Donoren von Hepacult verwendet und nach Ankunft der Zellsuspension sofort ausgesät. Somit unterschieden sich die Zellmodelle in der Kultivierung: sechs Wochen Kultivierung vs. Auftauen bzw. direkte Aussaat auf kollagenbeschichteten Zellkulturplatten. Außerdem unterschieden sich die drei Zellmodelle hinsichtlich ihrer Kultivierungsdauer. HepaRG-Zellen konnten insgesamt bis zu 9 Wochen (inklusive Expansion und Differenzierung) kultiviert werden, während bei PHH und KHH aufgrund der Dedifferenzierung nur eine Kultivierung von max. 5 Tagen möglich war. HepaRG-Zellen wiesen teilweise 3D-Strukturen auf, die spheroidartig aussahen und erst durch die Differenzierung entstanden waren (Abb. 9A). Es handelte sich um eine Mischpopulation, da es hepatozyten- und gallengangähnliche Zellen gab. KHH zeigten einen ebenen Zellrasen, auf dem sich einige kugelige Zellen befanden, die auf dem Rasen zu kleben schienen (Abb. 9B). Ferner waren keine klaren Zellmembranstrukturen sichtbar, dafür kleine, vermutlich lipidhaltige Vesikel. PHH bildeten einen pflastersteinartigen Zellrasen aus (Abb. 9C).

Die Zellen wiesen sichtbar mehrere Zellkerne auf und zeigten eine eindeutige Zellstruktur.



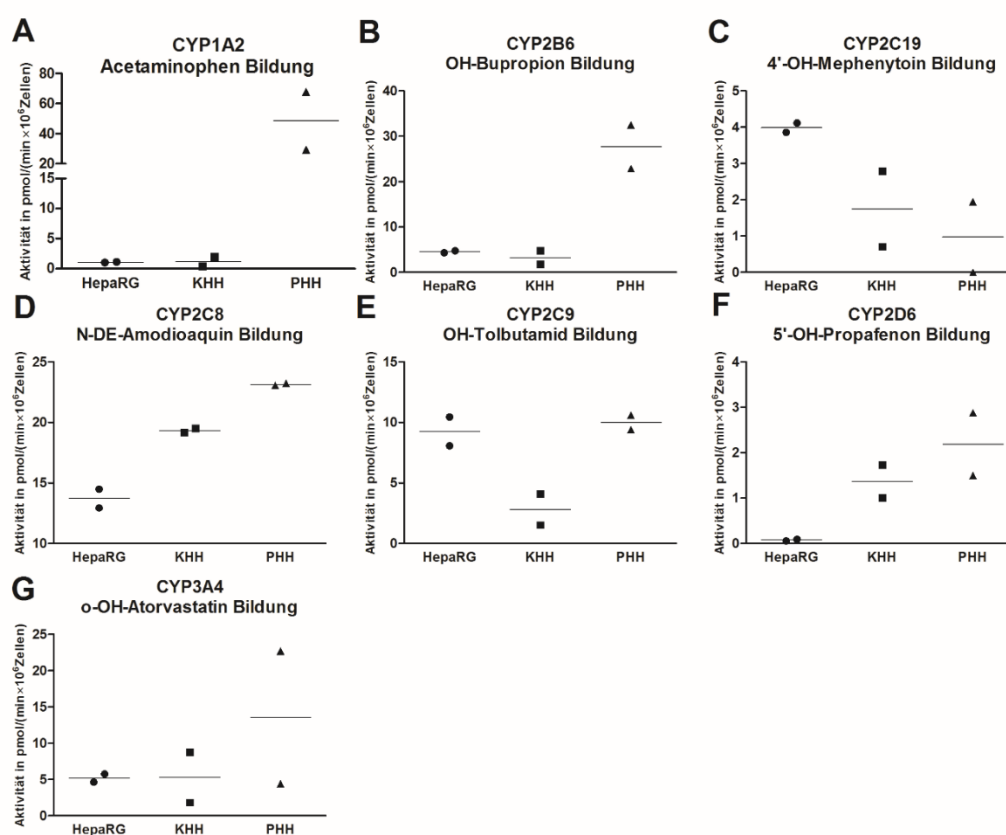
**Abb. 9: Morphologie der hepatischen Zellmodelle.** Phasenkontrastbilder von A) HepaRG-Zellen, B) kryokonservierten humanen Hepatozyten (KHH) und C) primären humanen Hepatozyten (PHH). Bei HepaRG-Zellen erfolgten die Aufnahmen nach zweiwöchiger Differenzierung mit 2 % DMSO, während bei KHH und PHH die Aufnahmen 24 h nach der Aussaat durchgeführt wurden. Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$  (linke Spalte) bzw. 200  $\mu\text{m}$  (rechte Spalte).

#### 3.1.2 Cytochrom-P450-Enzymaktivitäten der hepatischen Zellmodelle

Die verschiedenen hepatischen Zellmodelle wurden hinsichtlich ihrer CYP-Enzymaktivitäten mithilfe des CYP-Substrat-Cocktail-Assays verglichen. Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen CYP-Substraten inkubiert und dann die Bildung der Metabolite mittels LC-MS/MS gemessen. Bei einem PHH-Donor war keine CYP2C19 Aktivität messbar. Dies könnte aufgrund eines Polymorphismus (langsamer Metabolisierungstyp) aufgetreten sein.

### 3. Ergebnisse

Bei HepaRG-Zellen zeigte CYP2C8 mit Amodiaquin als Substrat die höchste Aktivität, aber auch die größte Variabilität (Abb. 10). Die niedrigste Aktivität wies CYP2D6 auf. Die CYP-Aktivitäten waren mit den Aktivitäten in KHH vergleichbar, wobei HepaRG-Zellen leicht erhöhte CYP2C9 und CYP2C19 Aktivitäten im Vergleich zu KHH aufwiesen. CYP2C8 hatte bei KHH eine höhere Aktivität als bei HepaRG-Zellen. KHH wiesen geringere CYP-Aktivitäten im Vergleich zu PHH auf (Faktor 2-60). Bei PHH zeigte CYP1A2 die höchste Aktivität, gefolgt von CYP2B6 und CYP2C8. Die CYP3A4 Aktivität war sehr variabel. Die beste Messbarkeit für CYP2D6 war bei PHH zu sehen. Insgesamt wiesen PHH die höchsten CYP-Aktivitäten im Vergleich zu HepaRG-Zellen und KHH auf.

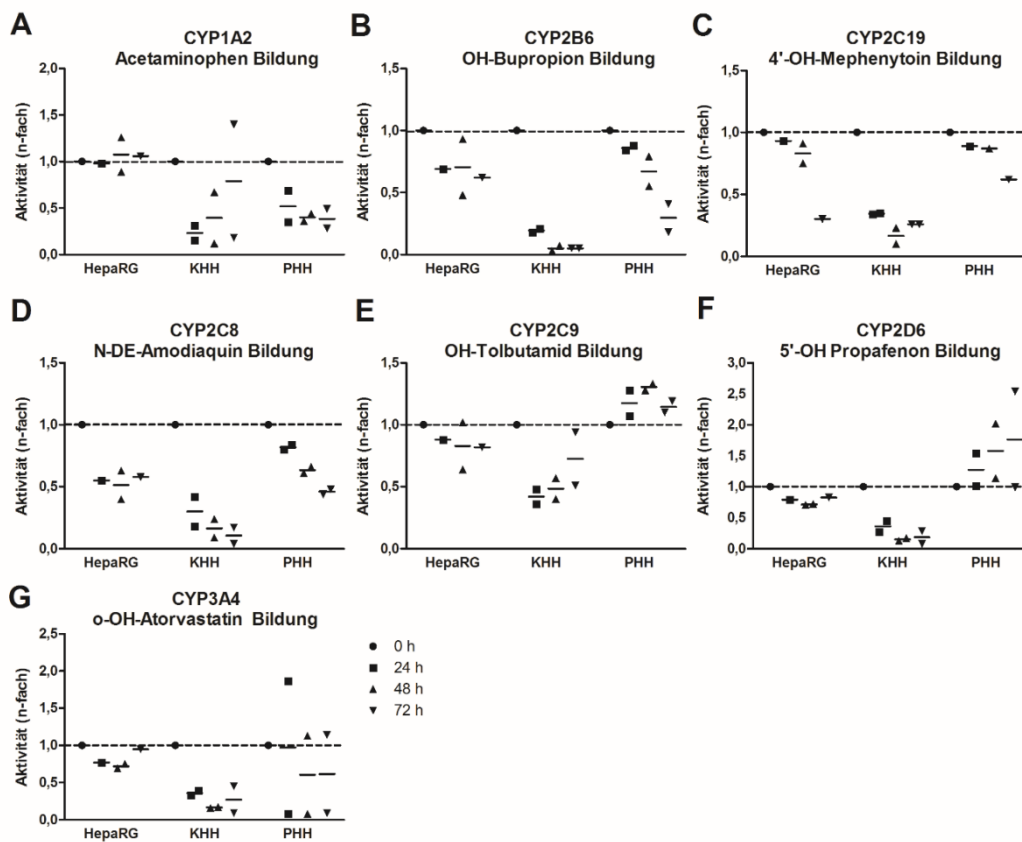


**Abb. 10: Absolute CYP-Enzymaktivitäten der hepatischen Zellmodelle.** Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9), F) 5'-OH-Propafenon (CYP2D6) und G) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde in HepaRG-Zellen (n = 2), kryokonservierten (KHH, n = 2) und primären Hepatozyten (PHH, n = 2) nach 24 h mittels LC-MS/MS gemessen. Die Metabolitenbildungsrate ist als Mittelwert mit den jeweiligen Einzelwerten dargestellt.

Des Weiteren wurde die Zeitabhängigkeit (bis zu 72 h) der CYP-Enzymaktivitäten in den verschiedenen Zellmodellen gemessen, um deren Stabilität zu testen. Stabile CYP-Aktivitäten waren für HepaRG-Zellen im ganzen Zeitraum sichtbar, nur CYP2C8

### 3. Ergebnisse

und CYP2B6 nahmen um ca. 40-50 % ab (Abb. 11). Im Gegensatz dazu fielen die CYP-Aktivitäten bei KHH und PHH bereits nach 24 h. Die stärksten Abnahmen waren bei KHH zu sehen (KHH um 80 %, bei PHH je nach Isoenzym 20 - 40 %). Vor allem nach 72 h wiesen KHH die niedrigsten Aktivitäten auf. Bei PHH zeigten einige CYP-Aktivitäten eine gleichmäßige Abnahme (außer CYP2C8, CYP2C9 und CYP2D6). Die meisten Aktivitäten waren nach 72 h auf fast 20 % der Ausgangsaktivität reduziert. Die CYP-Enzymaktivitäten waren sowohl bei KHH als auch bei PHH sehr variabel. HepaRG-Zellen zeigten somit über 72 h die stabilsten CYP-Enzymaktivitäten, während es bei KHH zu einer sehr schnellen Abnahme der CYP-Aktivitäten kam.



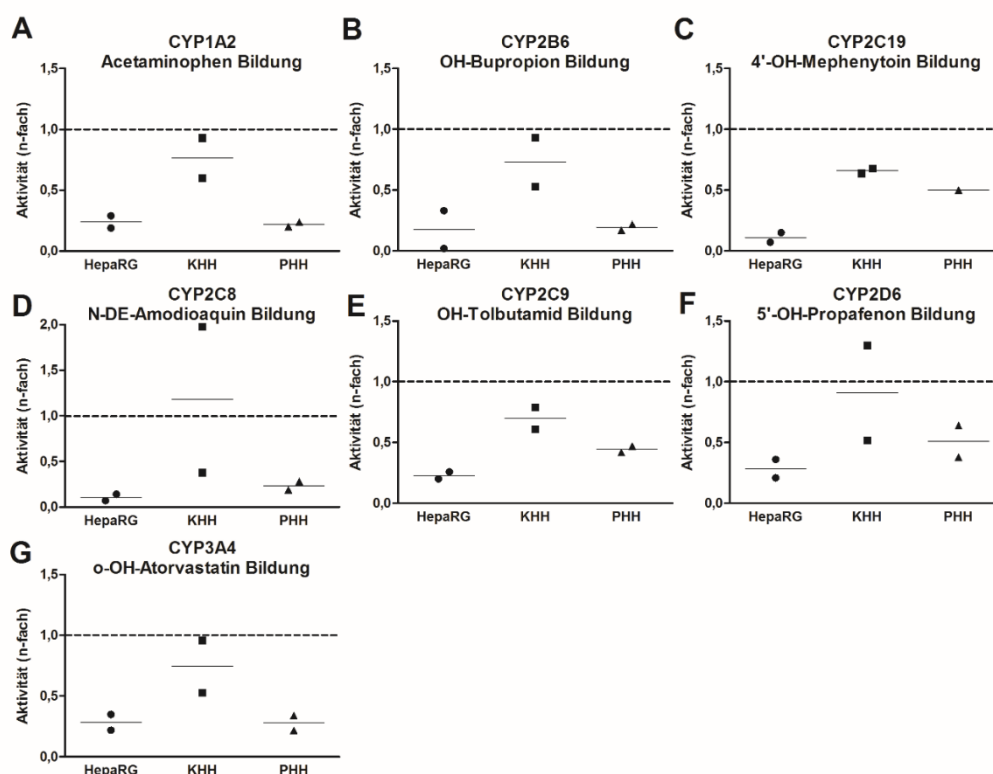
**Abb. 11: Zeitabhängiger Verlauf der CYP-Enzymaktivitäten in hepatischen Zellmodellen.** Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9), F) 5'-OH Propafenon und G) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde in HepaRG-Zellen (n = 1-2), kryokonservierten (KHH, n = 2) und primären Hepatozyten (PHH, n = 2) nach verschiedenen Zeitpunkten (0-72 h) mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind als Mittelwert mit den jeweiligen Einzelwerten relativ zum Zeitpunkt 0 h dargestellt.



### 3.1.3 Akut-Phase-Reaktion und Induzierbarkeit von CYP-Enzymaktivitäten in den hepatischen Zellmodellen

Die APR ist durch die Behandlung mit Cytokinen in Zellmodellen induzierbar. Außerdem kann die CYP-Enzymaktivität durch bestimmte Medikamente wie Rifampicin induziert werden. Dieses Verhalten sollte durch die Behandlung mit dem Cytokin IL-6 (10 ng/ml) und dem Induktor Rifampicin (10  $\mu$ M) auf Genexpressions- und Enzymaktivitätsebene untersucht werden. Bei PHH konnten nur CYP-Aktivitäten untersucht werden, da nicht genügend Zellmaterial vorhanden war.

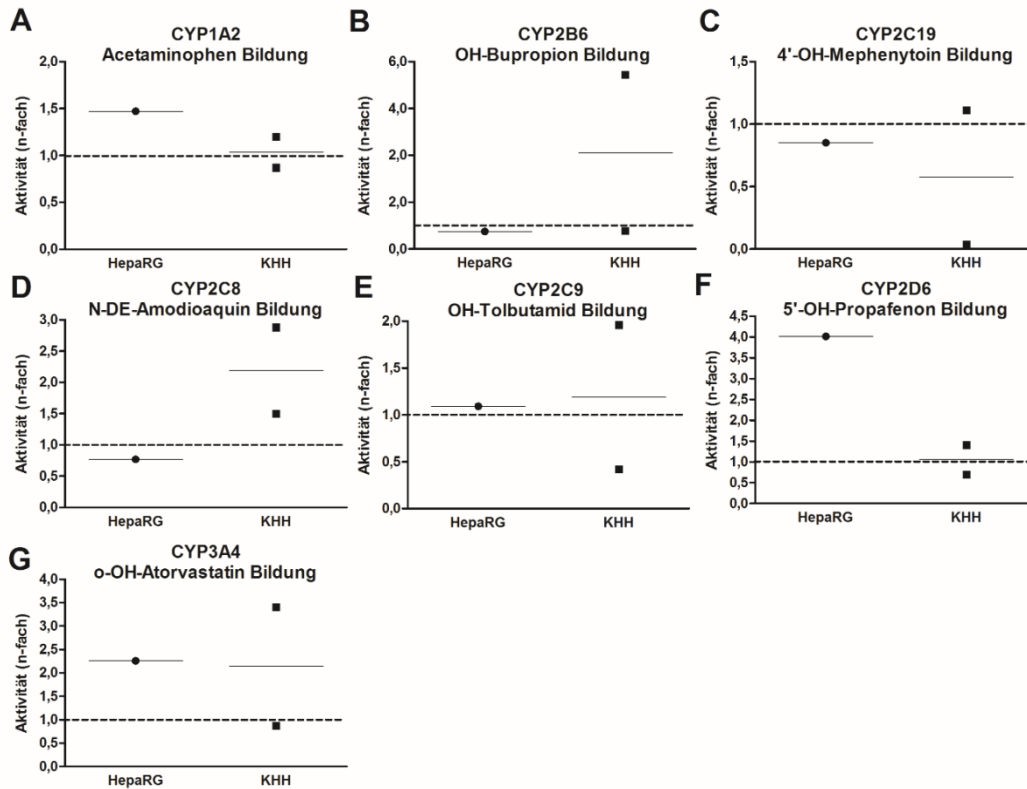
Die IL-6-Behandlung führte, wie erwartet, nach 72 h in HepaRG-Zellen zu einer hohen Abnahme aller CYP-Aktivitäten (um 60-80 %) (Abb. 12). CYP2B6 und CYP2C8 waren am stärksten betroffen. Eine starke Abnahme der CYP-Aktivitäten unter IL-6-Behandlung war auch bei PHH zu sehen (um 60-80 %). In KHH hingegen gab es nur geringe Effekte von IL-6 auf die CYP-Aktivitäten (Abnahme um 10-40 %).



**Abb. 12: Akut-Phase-Reaktion bei CYP-Enzymaktivitäten in hepatischen Zellmodellen.** HepaRG-Zellen (n = 2), kryokonservierte (KHH, n = 2) und primäre humane Hepatozyten (PHH, n = 2) wurden für 72 h mit 10 ng/ml IL-6 und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9), F) 5'-OH Propafenon und G) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind als Mittelwert mit den jeweiligen Einzelwerten relativ zu kontrollbehandelten Zellen dargestellt.

### 3. Ergebnisse

Die Rifampicin Behandlung führte zu einer Induktion der CYP2D6 und CYP3A4 Aktivität in HepaRG-Zellen (Abb. 13). Bei KHH war eine Induzierbarkeit von CYP2C8, CYP2B6 und CYP3A4 zu sehen. Allerdings wiesen die beiden KHH-Aliquots starke Abweichungen in ihren Aktivitäten auf.



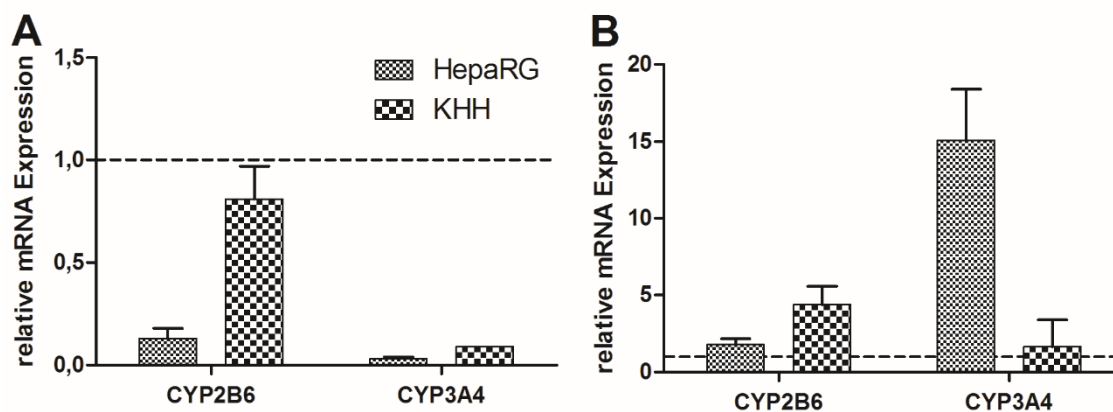
**Abb. 13: Induzierbarkeit der CYP-Enzymaktivitäten in hepatischen Zellmodellen.** HepaRG-Zellen (n = 1), kryokonservierte (KHH, n = 2) wurden für 72 h mit 10  $\mu$ M Rifampicin (Rifa) und DMSO als Kontrolle behandelt (keine Behandlung von PHH, da zu wenig Zellmaterial). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9), F) 5'-OH Propafenon und G) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind als Mittelwert mit den jeweiligen Einzelwerten relativ zu kontrollbehandelten Zellen dargestellt.

Auf Genexpressionsebene wurden *CYP2B6* und *CYP3A4* exemplarisch mittels qRT-PCR untersucht. IL-6 führte in HepaRG-Zellen zu der erwarteten Herunterregulierung der *CYP2B6* und *CYP3A4* mRNA (um 90 %) (Abb. 14A). Für *CYP3A4* war diese Herunterregulierung in KHH auch zu sehen, allerdings kam es bei *CYP2B6* im Gegensatz dazu nur zu einer Reduzierung um 20 %.

HepaRG-Zellen zeigten eine Induzierbarkeit von *CYP2B6* auf mRNA-Ebene vor allem von *CYP3A4* (bis zu 15-fach), während KHH nur eine gute Induzierbarkeit für *CYP2B6* (5-fach) zeigten. Eine Induktion der *CYP3A4* mRNA war in KHH nicht zu sehen.

### 3. Ergebnisse

Im Gegensatz zu KHH zeigten HepaRG-Zellen die erwartete Abnahme bzw. Induktion der CYPs sowohl auf mRNA- und Enzymaktivitätsebene. KHH waren nur in der Induzierbarkeit von CYP2B6 überlegen.



**Abb. 14: Akut-Phase-Reaktion und Induzierbarkeit der CYP-Genexpression in hepatischen Zellmodellen.** HepaRG-Zellen (n = 1) und kryokonservierte humane Hepatozyten (KHH, n = 1) wurden für 72 h mit A) 10 ng/ml IL-6 und dem Lösungsmittel als Kontrolle bzw. B) 10  $\mu$ M Rifampicin und DMSO als Kontrolle behandelt. Die Messung der CYP-Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Normalisierung auf *GAPDH* und Kontrolle). Die Genexpression ist als Mittelwert + Standardabweichung (technische Triplikate) relativ zur jeweiligen Kontrolle dargestellt.

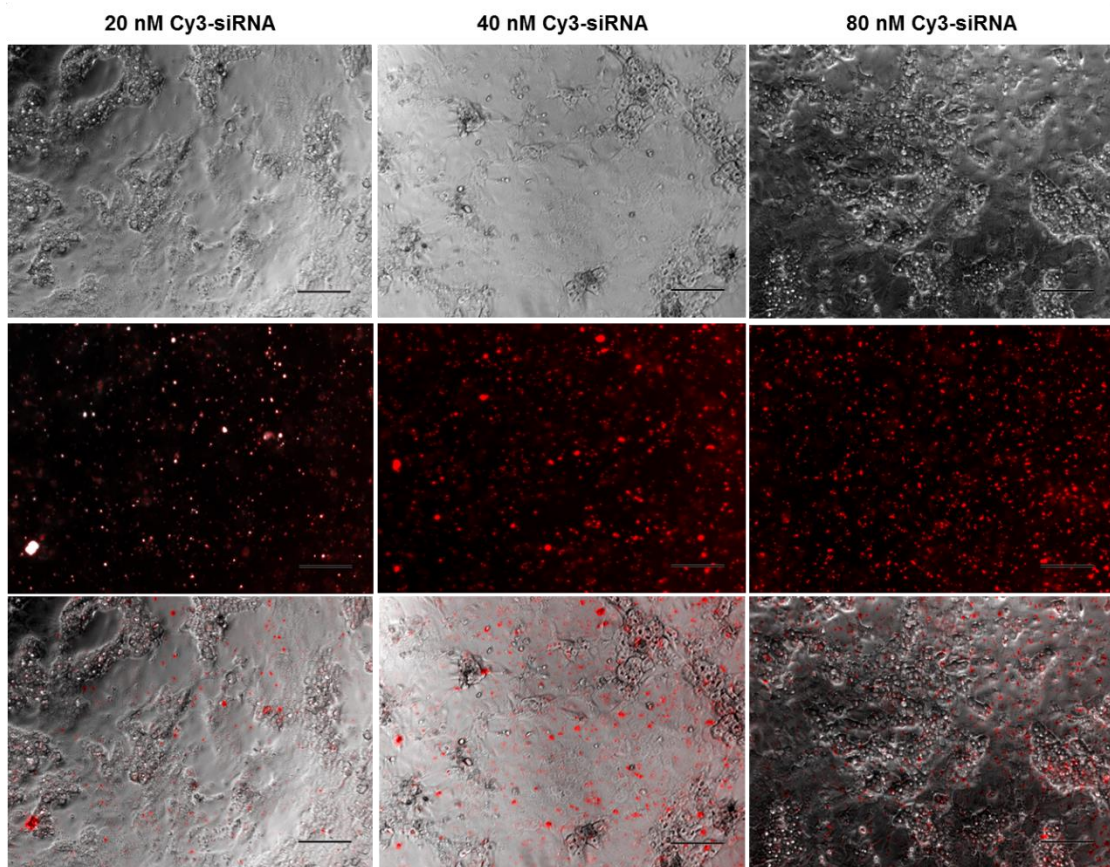
#### 3.1.4 Transfektionseffizienz in den hepatischen Zellmodellen

Für viele Genregulationsuntersuchungen ist es wichtig, dass ein hoher Prozentsatz an Zellen mit siRNAs bzw. miRNA-Mimics/Antagomirs transfiziert werden kann, damit überhaupt Effekte feststellbar sind. Deshalb wurde die Transfizierbarkeit bzw. Transfektionseffizienz der hepatischen Zellmodelle mit unterschiedlichen Mengen fluoreszenzmarkierter (Cy3) siRNA bzw. einer gegen RXR $\alpha$  gerichteten siRNA (siRXR $\alpha$ ) ausgetestet. Bei PHH konnte nur die Transfektionseffizienz der siRXR $\alpha$  untersucht werden, da für weitere Analysen nicht genügend Zellmaterial vorhanden war.

Die Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels Cy3-siRNA erfolgte mikroskopisch. Eine Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS) war dafür nicht geeignet, da Hepatozyten auch nach Vereinzeln die Eigenschaft haben, schnell zu verkleben bzw. verklumpen. Dies kann zum Verstopfen der Messküvette beim FACS führen.

### 3. Ergebnisse

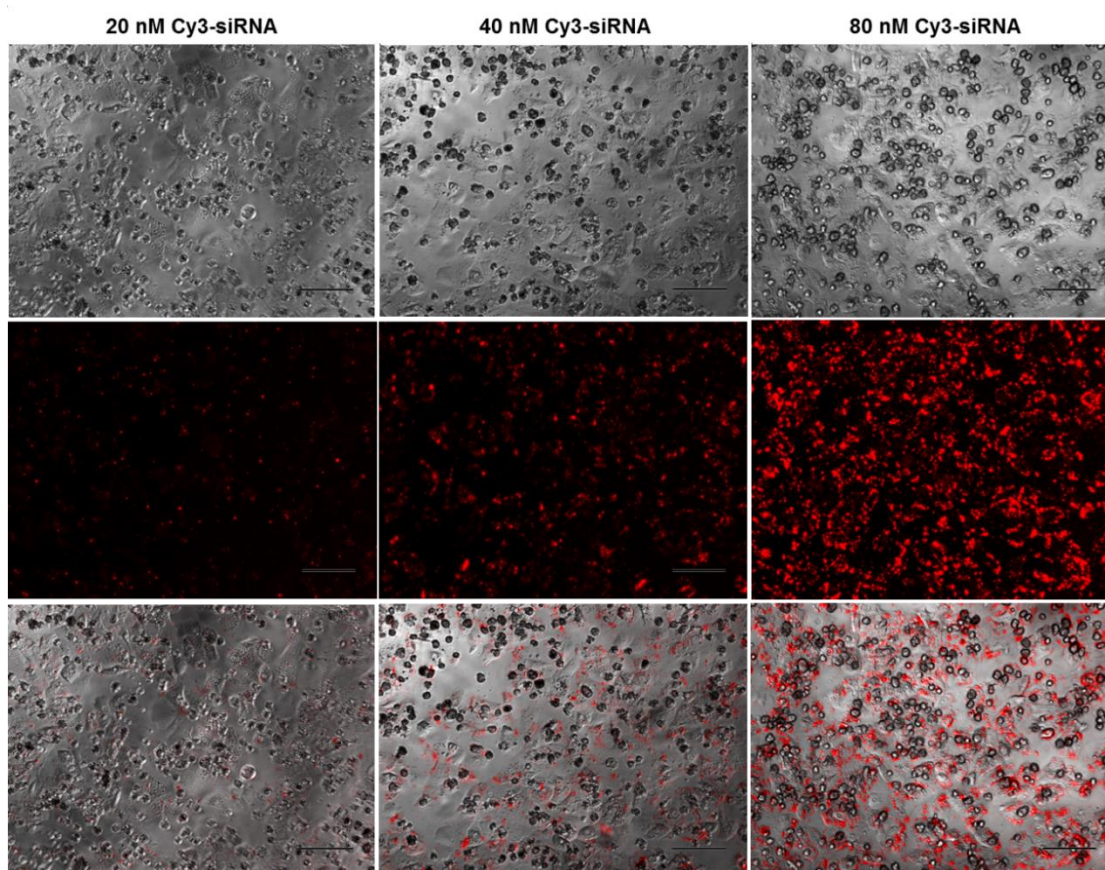
Bei HepaRG-Zellen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Cy3-markierten siRNA innerhalb der Zellen (Abb. 15). Bei KHH zeigte sich ein ähnliches Verhalten der Cy3-markierten siRNA (Abb. 16). Viele Zellen (kugelig) hatten sich aber nicht angeheftet und klebten an den adhären Zellen. Die Abschätzung der Transfektionseffizienz war durch die schlechte Sichtbarkeit der Zellstrukturen nur bedingt abschätzbar, dafür wurden in einem ausgewählten Quadrat die Gesamtzellzahl und der Anteil an rot-leuchtenden Zellen ermittelt. HepaRG-Zellen zeigten für 20 und 40 nM Cy3-siRNA eine bessere Transfizierbarkeit als KHH. Die Transfektionseffizienz bei 80 nM war hingegen in beiden Modellen vergleichbar (Tab. 37).



**Abb. 15 Transfektionseffizienz in HepaRG-Zellen.** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen Cy3-markierter siRNA (20-80 nM) transfiziert und nach 24 h mikroskopisch betrachtet und mit einem Laser angeregt. Das rote Leuchten innerhalb der Zellen zeigt die Aufnahme der markierten siRNA. Der Messbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Die erste Bildreihe zeigt Phasenkontrastbilder, die zweite Reihe Fluoreszenzbilder und die dritte Bildreihe die Überlagerung der Phasenkontrastbilder mit den Fluoreszenzbildern.



### 3. Ergebnisse



**Abb. 16: Transfektionseffizienz in kryokonservierten humanen Hepatozyten.** Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen Cy3-markierter siRNA (20-80 nM) transfiziert und nach 24 h mikroskopisch betrachtet und mit einem Laser angeregt. Das rote Leuchten innerhalb der Zellen zeigt die Aufnahme der markierten siRNA. Der Messbalken entspricht 100  $\mu$ m. Die erste Bildreihe zeigt Phasenkontrastbilder, die zweite Reihe Fluoreszenzbilder und die dritte Bildreihe die Überlagerung der Phasenkontrastbilder mit den Fluoreszenzbildern.

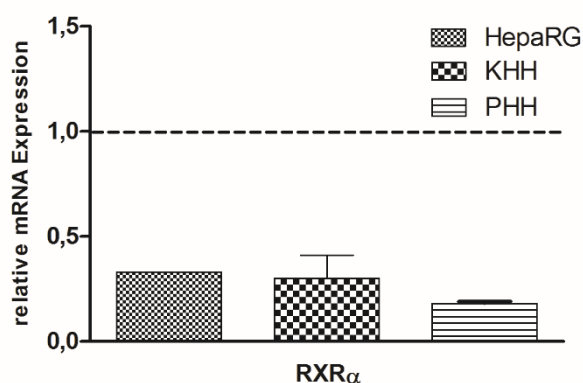
**Tab. 37: Transfektionseffizienz in den hepatischen Zellmodellen.** HepaRG-Zellen und kryokonservierte humane Hepatozyten (KHH) wurden mit unterschiedlichen Mengen Cy3-markierter siRNA (20-80 nM) transfiziert und nach 24 h mikroskopisch betrachtet und mit einem Laser angeregt (siehe Abb. 15 und Abb. 16). In einem ausgewählten Quadrat wurde die Gesamtzellzahl und den Anteil an rot-leuchtenden Zellen bestimmt. Der Prozentsatz an rot-leuchtenden Zellen im Vergleich zu der Gesamtzellzahl ist ein Maß für die Transfektionseffizienz.

	HepaRG-Zellen	Kryokonservierte humane Hepatozyten
<b>20 nM Cy3</b>	18 von 29 = 62 %	4 von 9 = 44 %
<b>40 nM Cy3</b>	16 von 19 = 84 %	5 von 9 = 55 %
<b>80 nM Cy3</b>	11 von 13 = 85 %	13 von 15 = 87 %

Die Zellmodelle wurden zudem mit einer bereits früher validierten siRNA transfiziert, die gegen RXR $\alpha$  (siRXR $\alpha$ ) gerichtet war (Keller et al. 2016), um die Transfektionseffizienz auf mRNA-Ebene zu überprüfen. Die Transfektion der siRXR $\alpha$  (20 nM) führte in allen Zellmodellen zu einem Knockdown von RXR $\alpha$  auf 20-30 %, was eine gute Transfektionseffizienz widerspiegelt (Abb. 17). PHH zeigten mit 82 % die beste Transfektionseffizienz. Alle Zellmodelle wiesen somit eine hohe

Transfektionseffizienz auf, die zu einem Knockdown von RXR $\alpha$  nach 72 h auf mRNA-Ebene führte.

Der siRNA-gerichtete KD der RXR $\alpha$ -mRNA bietet somit eine bessere Aussage über die Transfektionseffizienz in den Zellmodellen als die Cy3-markierte siRNA. Die Transfektion mit Cy3-markierter siRNA eignete sich zur Überprüfung der eigentlichen Aufnahme der siRNA in die Zellen. Sie eignet sich nicht zur Quantifizierung, da die Transfektionseffizienz zumindest bei KHH unterschätzt wurde.



**Abb. 17: Knockdown von RXR $\alpha$  in hepatischen Zellmodellen.** HepaRG-Zellen (n = 1), kryokonservierte (KHH, n = 1) und primäre humane Hepatozyten (PHH, n = 1) wurden mit einer siRNA gegen RXR $\alpha$  (siRXR $\alpha$ ) bzw. siRNA-Kontrolle (siCTR) (20 nM) transfiziert und nach 72 h lysiert. Die Messung der RXR $\alpha$  Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Normalisierung auf *GAPDH* und siRNA-Kontrolle). Die Genexpression ist als Mittelwert + Standardabweichung (technische Triplikate) relativ zu kontrollbehandelten Zellen dargestellt.

Die Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass KHH nicht die erwartete Reproduzierbarkeit und das gewünschte Verhalten der CYP-Aktivitäten zeigten. Eine hohe Variabilität der CYP-Aktivitäten war auch bei PHH zu sehen gewesen. Hinzu kam die seltene Verfügbarkeit von PHH. Daher wurden HepaRG-Zellen aufgrund ihrer stabilen CYP-Enzymaktivitäten, guten Verfügbarkeit und getesteten Reproduzierbarkeit für alle weiteren Experimente verwendet.

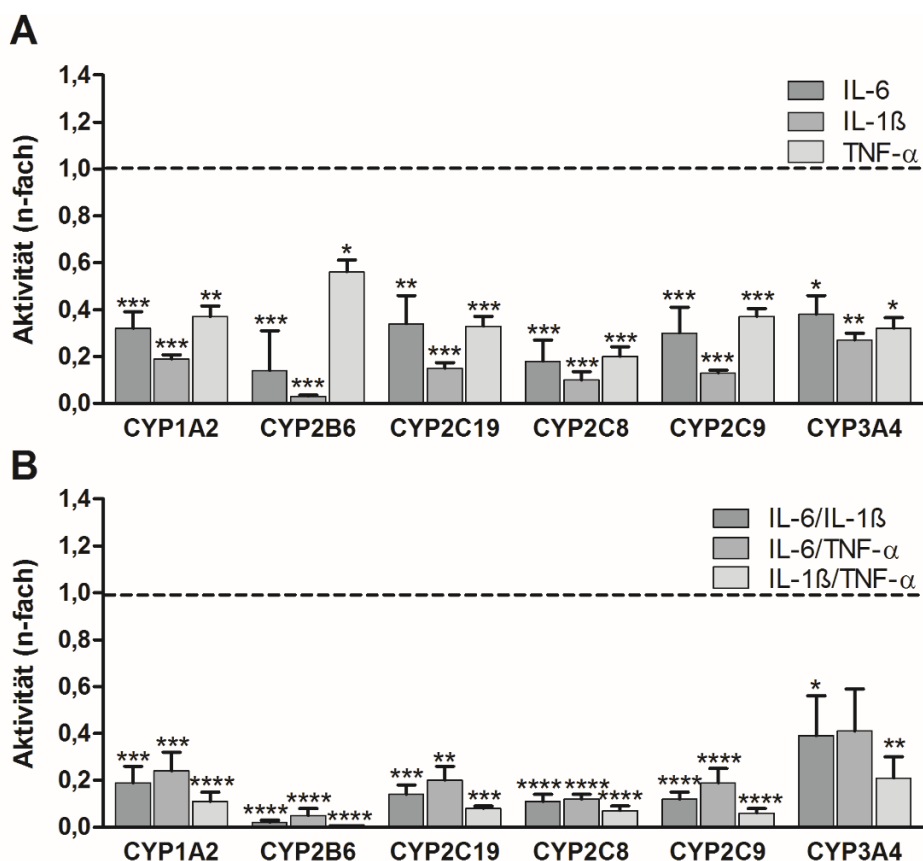
### 3.2 Rolle von nukleären Rezeptoren bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung

Da NR eine Rolle bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei entzündlichen Bedingungen zu spielen scheinen, sollte vor allem die Regulation des Bindungspartner RXR $\alpha$  und dem NR PXR durch Cytokine mit einem Fokus auf das Proteinverhalten untersucht werden.

#### **3.2.1 Einfluss von Cytokinen auf die Cytochrom-P450-Enzymaktivität**

Bei entzündlichen Geschehen werden nicht nur einzelne Cytokine produziert, sondern es kommt zu einer parallelen Ausschüttung verschiedener Cytokine. Zuerst sollte überprüft werden, ob Cytokin-Kombinationsbehandlungen im Vergleich zu Einzelbehandlungen zu additiven oder synergistischen Effekten bei der CYP-Enzymaktivität führten. In HepaRG-Zellen wurden sowohl der Einfluss von Cytokin-Einzelbehandlungen (IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)) als auch von Kombinationsbehandlungen auf CYP-Aktivitäten untersucht (Abb. 18).

Alle Cytokin-Einzelbehandlungen führten, wie erwartet, zu einer starken Abnahme der CYP-Aktivitäten (um 40-80 %) (Abb. 18A). IL-1 $\beta$  zeigte die stärksten Effekte, während TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) die schwächsten Effekte auslöste. Alle Cytokin-Kombinationen führten zu einer enormen Reduzierung der CYP-Enzymaktivitäten, die stärker im Vergleich zu den Einzelbehandlungen war (Abb. 18B). Die Kombinationsbehandlungen hatten einen additiven Effekt. Allerdings waren die CYP-Enzyme unterschiedlich stark betroffen. Am stärksten war CYP2B6 beeinflusst, während CYP3A4 weniger sensitiv reagierte. Bei allen CYPs war die Kombination aus IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  am stärksten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Cytokine eine kombinatorische Wirkung auf die CYP-Enzymaktivität haben.



**Abb. 18: Einfluss von Cytokinen auf CYP-Enzymaktivitäten.** HepaRG-Zellen wurden für 72 h mit A) IL-6 (10 ng/ml), IL-1β (5 ng/ml) bzw. TNF-α (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle oder B) Kombinationen aus IL-6/IL-1β, IL-6/TNF-α und IL-1β/TNF-α behandelt (n = 3). Die Bildung der Metabolite Acetaminophen (CYP1A2), OH-Bupropion (CYP2B6), 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), OH-Tolbutamid (CYP2C9) und o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zur Kontrolle dargestellt. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

### 3.2.2 Einfluss von Cytokinen auf die Expression von RXRα

RXRα ist ein wesentlicher Bindungspartner von NR wie CAR und PXR und spielt eine Rolle in der Regulation der CYPs. Zu der Beteiligung von RXRα an der Herunterregulierung der ADME-Gene bei Entzündung gab es schon erste Hinweise. Der Einfluss von Cytokinen auf RXRα sollte vor allem auf Proteinebene untersucht werden, da bisherige Untersuchungen keine signifikante Veränderung von RXRα auf mRNA-Ebene ergaben. Dies wurde in HepaRG-Zellen in Einzel- und Kombinationsbehandlungen von Cytokinen analysiert.

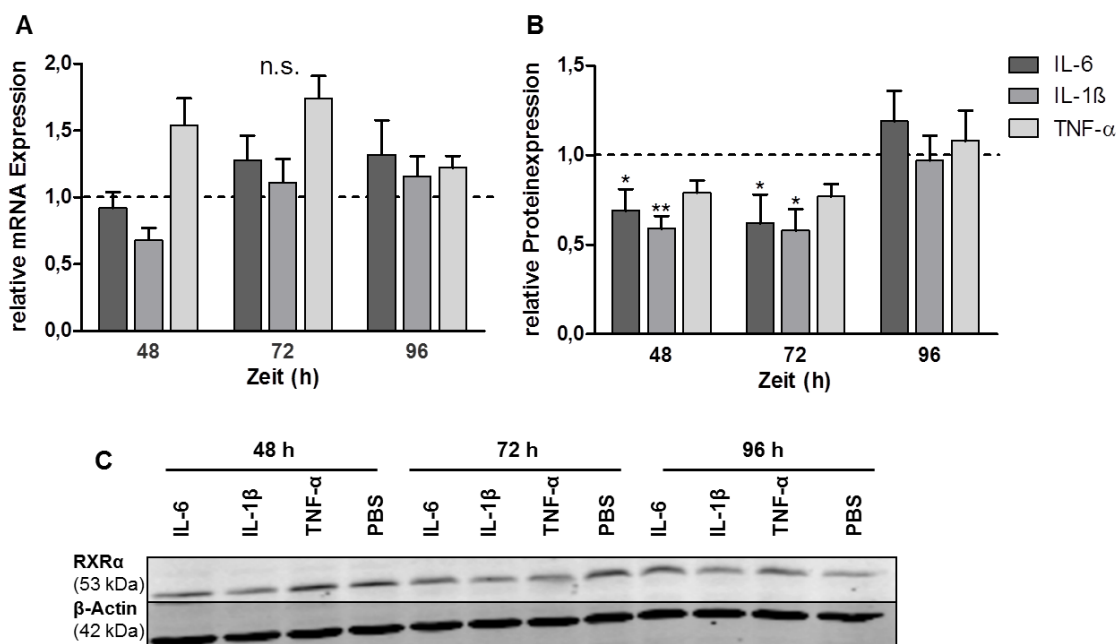
#### 3.2.2.1 Einzelbehandlungen von Cytokinen

Zuerst wurden die Effekte der Cytokine IL-6, IL-1β und TNF-α auf die Gen- und Proteinexpression von RXRα bei Einzelbehandlungen in HepaRG-Zellen betrachtet. Auf mRNA-Ebene kam es zu keinen signifikanten Änderungen von RXRα, während



### 3. Ergebnisse

es auf Proteinebene zu einer Reduzierung um 30-40 % nach 48-72 h kam, je nach Cytokin (Abb. 19). Dabei war die Wirkung von IL-1 $\beta$  am stärksten und die von TNF- $\alpha$  am schwächsten. Nach 96 h erreichte das RXR $\alpha$ -Protein in den cytokinbehandelten Zellen wieder sein Ausgangsniveau.



**Abb. 19: Einfluss von Cytokinen auf RXR $\alpha$ .** HepaRG-Zellen wurden für 48 - 96 h mit IL-6 (10 ng/ml), IL 1 $\beta$  (5 ng/ml) bzw. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt (n = 3 - 4). A) Die Messung der RXR $\alpha$ -Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Normalisierung auf *GAPDH* und Kontrolle). B) Die Messung der RXR $\alpha$ -Proteinexpression erfolgte mittels Western Blotting (Normalisierung auf  $\beta$ -Actin und Kontrolle). C) Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01.

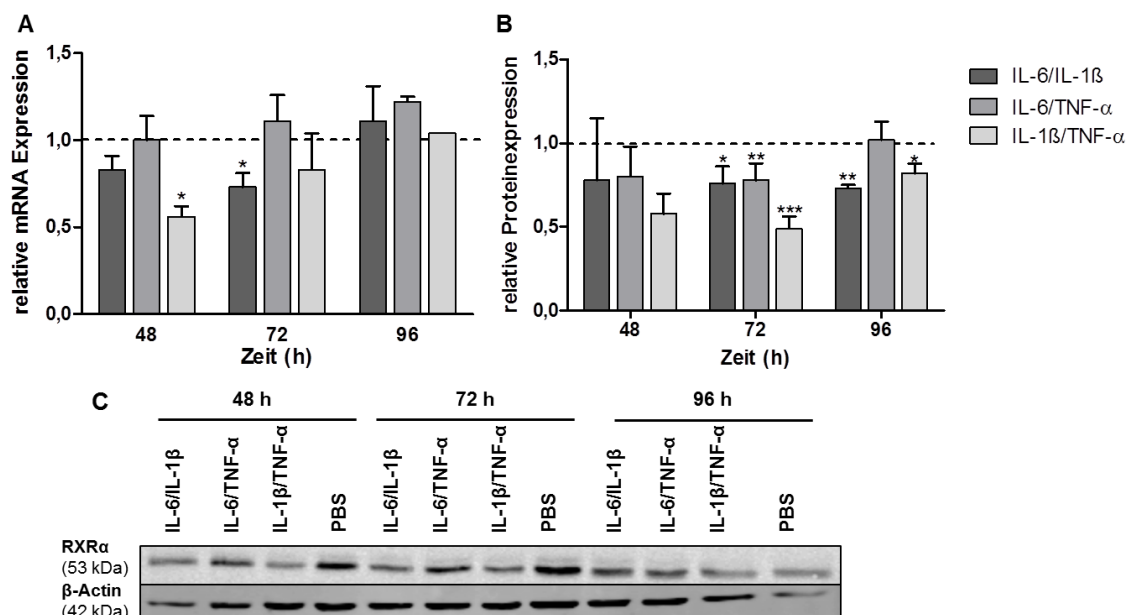
#### 3.2.2.2 Kombinationsbehandlungen von Cytokinen

Die Effekte der Cytokin-Kombinationsbehandlungen wurden auf die Gen- und Proteinexpression von RXR $\alpha$  in HepaRG-Zellen untersucht, um zu überprüfen, ob es zu additiven oder synergistischen Effekten im Vergleich zu den Einzelbehandlungen kam.

Die Kombinationsbehandlung aus IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führte bereits nach 48 h zu einer signifikanten Abnahme (um 50 %) der RXR $\alpha$ -mRNA, diese erreichte aber nach 96 h das Ausgangsniveau (Abb. 20A). Des Weiteren führte die Kombination aus IL-6 und IL-1 $\beta$  zu einer Abnahme der RXR $\alpha$ -mRNA nach 72 h (um ca. 40 %). Die Kombination aus IL-6 und TNF- $\alpha$  hatte keine Auswirkungen auf die RXR $\alpha$  Genexpression. Auf Proteinebene zeigten alle drei Kombinationen Auswirkungen auf RXR $\alpha$  nach 72 h (Abnahme um 20-50 %).

### 3. Ergebnisse

Unter Cytokinbehandlung kam es im Gegensatz zur mRNA zu einer teilweisen Abnahme des RXR $\alpha$ -Proteins. Dies war auch bei Cytokin-Kombinationsbehandlungen zu sehen gewesen. Allerdings war RXR $\alpha$  nach 96 h im Vergleich zu den Einzelbehandlungen noch immer herunterreguliert. Damit hatten Cytokin-Kombinationsbehandlungen auf Proteinebene länger andauernde Effekte.



**Abb. 20: Einfluss von Cytokin-Kombinationen auf RXR $\alpha$ .** HepaRG-Zellen wurden für 48 - 96 h mit Kombinationen aus IL-6 (10 ng/ml)/IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml)/TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) bzw. IL-1 $\beta$  (5 ng/ml)/TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt (n = 2-3). A) Die Messung der RXR $\alpha$ -Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Normalisierung auf *GAPDH* und Kontrolle). B) Die Messung der RXR $\alpha$ -Proteinexpression erfolgte mittels Western Blotting (Normalisierung auf  $\beta$ -Actin und Kontrolle). C) Repräsentative Darstellung eines Western Blots. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001.

#### 3.2.2.3 Induktion von post-translationalen Modifikationen

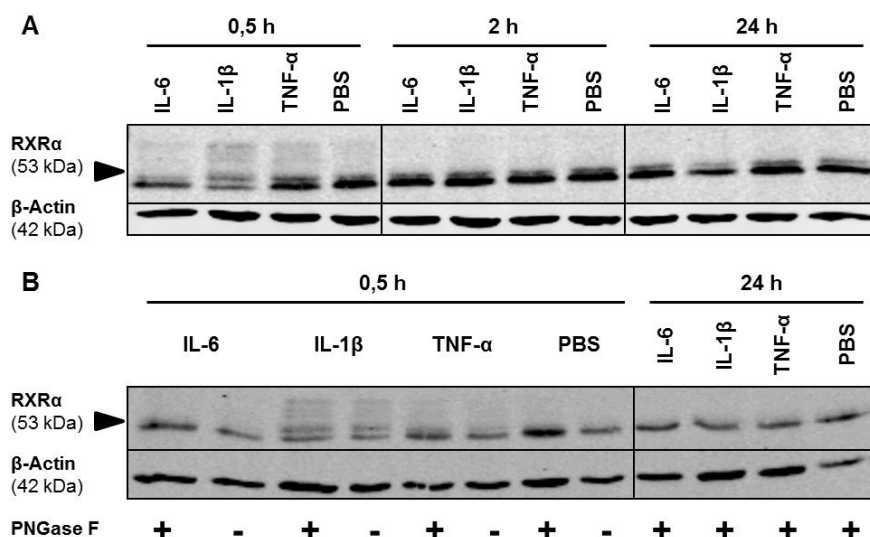
Auf Proteinebene kam es durch Cytokine nur zu einer teilweisen Reduktion von RXR $\alpha$ , was nicht allein zu der starken Herunterregulierung der ADME-Gene führen kann (Abb. 18, Abb. 19 und Abb. 20). Deshalb wurden auch Veränderungen von RXR $\alpha$  durch post-translationale Modifikationen unter Cytokineinfluss betrachtet.

HepaRG-Zellen zeigten nach 0,5 h unter IL-1 $\beta$ -Behandlung im Vergleich zu den anderen Cytokinbehandlungen und der Kontrolle eine zweite Bande bzw. weitere RXR $\alpha$  Spezies, ähnlich wie bei Zimmerman et al. (2006), im Western Blot. Diese Bande verschwand aber nach 2 h wieder (Abb. 21A). Um zu überprüfen, ob es sich dabei eventuell um eine Glykosylierung des RXR $\alpha$ -Proteins handelte, wurden die Proben mit PNGase F, einer Glykosidase, behandelt. Durch die Deglykosylierung des

### 3. Ergebnisse

Proteins kommt es zu einer veränderten elektrophoretischen Mobilität des Proteins im Western Blot. Bei IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen führte die Behandlung mit PNGase F aber zu keiner Veränderung. Dies galt auch für IL-6- und TNF- $\alpha$ -behandelte Zellen (Abb. 21B).

Um das Verhalten des RXR $\alpha$ -Proteins unter Cytokinbehandlung weiter zu untersuchen, wurden 2D-Western Blots in Zusammenarbeit mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin von Christine Meckert durchgeführt. Dabei wurden die Proteine zuerst aufgrund ihrer elektrischen Ladung aufgetrennt, bis sie ihren isoelektrischen Punkt erreicht hatten (isoelektrische Fokussierung). Danach führte die zweite Dimension zu einer Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer Größe analog zur SDS-PAGE.

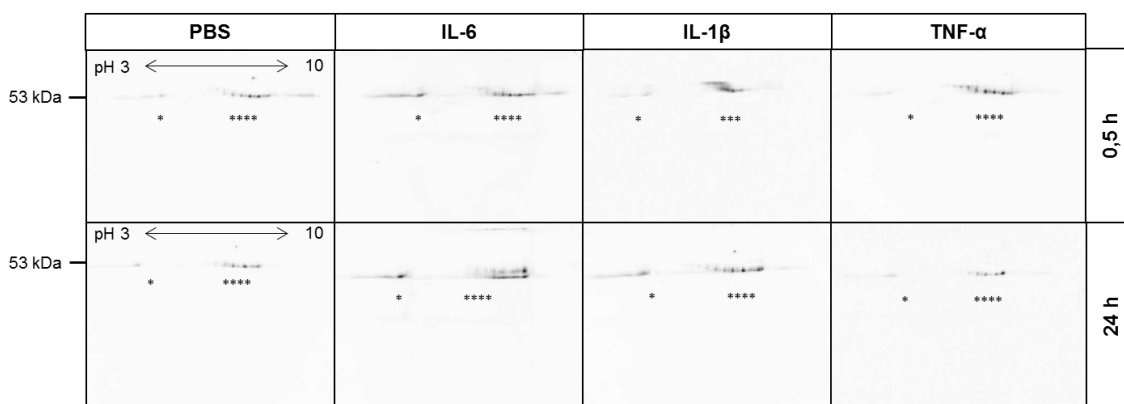


**Abb. 21: Einfluss von Cytokinen auf RXR $\alpha$ -Proteinmodifikationen - Glykosylierung.** HepaRG-Zellen wurden für 0,5 – 24 h mit IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) bzw. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Die Messung der RXR $\alpha$ -Proteinexpression erfolgte mittels A) Western Blotting bzw. B) Vorbehandlung der Proben mit Endoglykosidase PNGase F (Deglykosylierung) und anschließendes Western Blotting. Der schwarze Pfeil weist auf das Auftauchen einer weiteren RXR $\alpha$  Spezies hin.

Die Auftrennung der Proteinlysate der Kontrollbehandlung (PBS) mittels 2D-Western Blotting führte nach 0,5 h zu vier immunreaktiven Punkten (Spezies, pH-Wert ca. 7-8), bei denen es sich vermutlich um Isoformen von RXR $\alpha$  handelte. Diese Punkte blieben nach 24 h bestehen (Abb. 22). Durch die Behandlung mit IL-6 kam es zu einem größeren Punkt bei einem pH-Wert von ca. 4 als bei der Kontrolle. Dieser Punkt war auch noch nach 24 h sichtbar. Dies könnte auf eine post-translationalale Modifikation von RXR $\alpha$  hinweisen, die zu einer höheren Menge der RXR $\alpha$ -Variante im sauren Bereich führte. Dieser Punkt war in IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen etwas

### 3. Ergebnisse

schwächer als bei IL-6 sichtbar. Bei TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen war dieser Punkt ähnlich wie bei den kontrollbehandelten Zellen (nach 0,5 h). Bei IL-6- und TNF- $\alpha$ -behandelten Zellen kam es nach 0,5 h auch zum Auftauchen von vier Punkten wie bei der Kontrollbehandlung, allerdings waren diese nach 24 h bei IL-6 nicht mehr eindeutig sichtbar. IL-1 $\beta$ -behandelte Zellen wiesen nach 0,5 h keine eindeutige Trennung in vier Punkte auf, sondern zeigten ca. drei Punkte mit einem niedrigeren pH-Wert (ca. 6-7). Der vierte fehlende Punkt bei ca. pH 8 tauchte nach 24 h allerdings wieder auf. Eventuell konnte es durch eine post-translationale Modifikation von RXR $\alpha$ , induziert durch IL-1 $\beta$ , zu einer Verschiebung bzw. Auslöschung des vierten Punktes nach 0,5 h gekommen sein. Durch Phosphorylierung kann sich der isoelektrische Punkt des Proteins in den sauren Bereich verschieben. Somit könnte RXR $\alpha$  durch IL-1 $\beta$  nach 0,5 h einen phosphorylierten Zustand aufweisen. Der Zustand des RXR $\alpha$ -Proteins scheint somit von der jeweiligen Cytokinbehandlung abhängig zu sein. Die IL-6- und IL-1 $\beta$ -Behandlungen könnten post-translationale Modifikationen von RXR $\alpha$  induziert haben. Allerdings ist nicht klar, welche post-translationale Modifikation bei IL-6 eine Rolle spielen könnte, da die Isoform im sauren Bereich abnahm.



**Abb. 22: Einfluss von Cytokinen auf RXR $\alpha$ -Proteinmodifikationen - 2D-Western Blotting.** HepaRG-Zellen wurden für 0,5 – 24 h mit IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) bzw. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und dann als Zellpellet weggefroren (n = 3). Die Messung der RXR $\alpha$ -Proteinexpression erfolgte mittels 2D-Western Blotting durch Christine Meckert am Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin. Immunoreaktive Punkte sind für eine bessere Zuordnung zusätzlich mit \* gekennzeichnet.

#### 3.2.3 Einfluss von Cytokinen auf die Expression von PXR

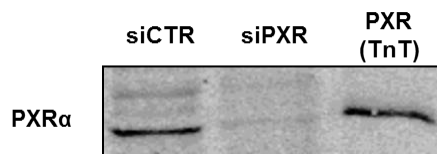
Eine Rolle des NRs PXR bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei entzündlichen Bedingungen wurde bereits in der Literatur diskutiert. Allerdings kam es je nach untersuchtem Modell oder Cytokin zu widersprüchlichen Ergebnissen. Eine starke Herunterregulierung von PXR auf mRNA-Ebene war bereits in HepaRG-

### 3. Ergebnisse

---

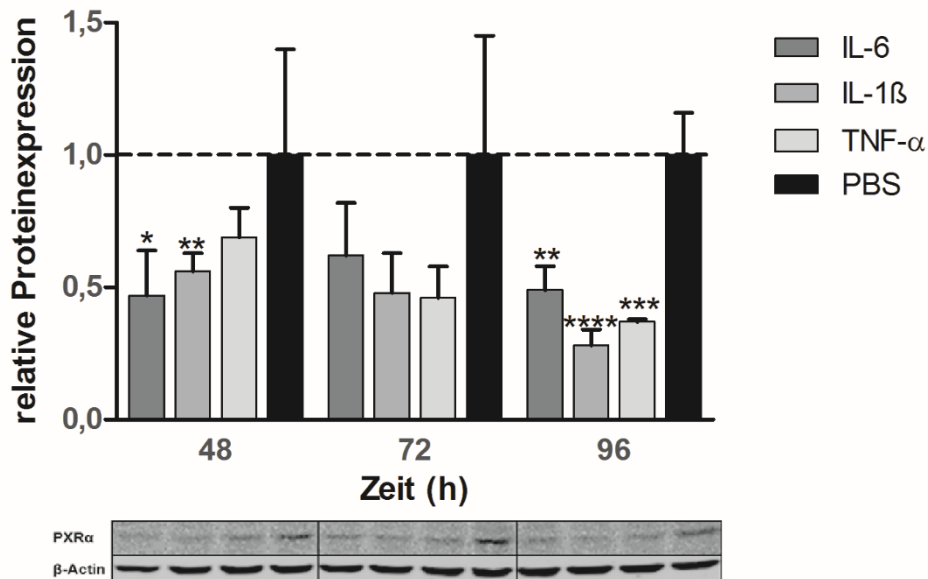
Zellen und PHH gezeigt worden (Klein et al. 2015). Allerdings war aufgrund des Mangels an guten PXR-Antikörpern noch nicht viel über das Proteinverhalten bekannt gewesen.

Hierfür wurde zunächst ein neuer PXR-Antikörper mit einem *in vitro* translatierten PXR-Protein als Positivkontrolle validiert. Als Negativkontrolle wurde ein Knockdown von PXR mit einer siRNA (siPXR) im Vergleich zu einer Kontrolltransfektion (siCTR) in HepaRG-Zellen durchgeführt (Abb. 23). Die Zellen wurden mittels RIPA-Puffer lysiert, da hier eine bessere Detektion von PXR im Vergleich zum Passive Lysis Buffer möglich war. Die PXR Bande in den kontrolltransfizierten HepaRG-Zellen wies die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das *in vitro* translatierte PXR-Protein auf (ca. 50 kDa), während in der Negativkontrolle eine deutlich geringere Immunoreaktivität zu sehen war.



**Abb. 23: Validierung des PXR-Antikörpers in HepaRG-Zellen.** HepaRG-Zellen wurden mit einer siRNA gegen PXR (siPXR) bzw. siRNA-Kontrolle (siCTR) (20 nM) transfiziert und nach 72 h lysiert. Die Detektion der PXR-Proteinexpression (50 kDa) erfolgte mittels Western Blotting. Dabei wurde *in vitro* translatiertes PXR als Positivkontrolle aufgetragen.

Die PXR-Proteinexpression wurde dann in HepaRG-Zellen mit und ohne Cytokinbehandlung untersucht (Abb. 24). Nach 48 h kam es durch alle Cytokinbehandlungen zu einer starken Abnahme des PXR-Proteins (um 30-50 %). Die Herunterregulierung von PXR blieb auch nach 72 und 96 h bestehen. Nach 96 h kam es sogar zu einer weiteren Abnahme von PXR unter IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ -Behandlung (um 60-70 %). IL-1 $\beta$  führte somit zur stärksten Abnahme von PXR nach 96 h (um ca. 70 %). Demzufolge führen Cytokine zu einer starken, andauernden Herunterregulierung von PXR auf Proteinebene.



**Abb. 24: Einfluss von Cytokinen auf die PXR-Proteinexpression.** HepaRG-Zellen wurden für 48 - 96 h mit IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) bzw. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und dann lysiert (n = 3). Die Messung der PXR-Proteinexpression (50 kDa) erfolgte mittels Western Blotting (Normalisierung auf  $\beta$ -Actin (42 kDa) und Kontrolle). Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

### 3.3 Rolle von entzündungsassoziierten microRNAs in der ADME-Genregulation

Teile der im Folgenden dargestellten Ergebnisse wurden bereits in der Arbeit von Kugler et al. (2019) veröffentlicht. Es wurden nur Daten verwendet, die Nicole Kugler selbst generiert und analysiert hatte.

Die negative Regulation von ADME-Genen durch miRNAs ist seit einiger Zeit bekannt, allerdings wurde die Rolle der miRNAs im Zusammenhang mit der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung bisher kaum untersucht. Daher sollte überprüft werden, ob entzündungsassoziierte miRNAs ADME-Gene negativ regulieren können und damit zu der koordinierten Herunterregulierung bei Entzündung beitragen.

#### 3.3.1 Identifizierung von funktionalen microRNA-Bindestellen in ADME-Genen

Mithilfe von TargetScan waren für die 40 entzündungsassoziierten miRNAs Bindestellen in 35 ADME-Genen *in silico* vorhergesagt worden, dadurch entstanden 208 miRNA-mRNA Assoziationen (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016). Da die Rolle von NR bei der Herunterregulierung von ADME-Genen ebenso im Fokus stand, wurden für die NR PXR (*NR1I2*) und CAR (*NR1I3*) noch zusätzliche Vorhersagen für die 40 miRNAs durchgeführt. Die vorhergesagten Bindestellen in ADME-Genen

sollten für diese miRNAs genauer untersucht werden, da viele Bindestellen *in silico* vorhergesagt, aber letztendlich nicht funktionell sind. Durch Luciferase-Reporter-Assays lässt sich die Funktionalität einer Bindestelle nachweisen, da die Bindung einer miRNA an die Bindestelle zu einer Reduzierung der Luciferaseaktivität führt. Es wurden 14 relevante Bindestellen in ADME-Genen, wie CYPs und Regulatoren, z. B. RXR $\alpha$  und CAR, für miR-130b, miR-155, miR-224, miR-452, miR-543 und miR-6807 analysiert. MiR-130b wurde als eine weitere bereits bekannte entzündungsassoziierte miRNA miteinbezogen. Die Bindestellen wurden aufgrund ihrer Vorhersage (hoher Context++ Score Perzentil) und Vorkommen im Haupttranskript ausgesucht (Tab. 38). Sequenzen mit den jeweiligen vorhergesagten Bindestellen (MRE) waren in verschiedenen Varianten (1x und 3x Wiederholung der Bindestellen, Deletion der Seed-Sequenzen bzw. komplementären miRNA Sequenzen als Positivkontrolle) im Luciferase-Plasmid pmirGLO kloniert.

Huh7-Zellen wurden als Zellmodell verwendet, da sie im Vergleich zu HepaRG-Zellen eine bessere Transfektionseffizienz für Plasmide aufweisen. Die Zellen wurden kotransfiziert mit Luciferase-Reporter-Plasmiden (pmirGLO, 100 ng), die vorhergesagte miRNA-Bindestellen in ADME-Genen enthielten, und miRNA-Mimics (100 nM) bzw. siRNA-Kontrolle (siCTR) und nach 48 h lysiert (Abb. 25).

Die Positivkontrollen führten zu einer ca. 90 % Reduzierung der Luciferaseaktivität. Für miR-155 konnten in CYP2C19 und CYP2C9 Bindestellen validiert werden, da es zu einer Abnahme der Luciferaseaktivität der MREx1 und MREx3 Konstrukte kam. Die Konstrukte ohne Seed-Sequenz (Del) führten, wie erwartet, zu keiner signifikanten Abnahme der Luciferaseaktivität, da hier die miRNA nicht mehr an die Bindestelle binden konnte. Dieses Verhalten zeigte sich auch für miR-452 in CYP2C8, miR-224 in CYP3A4 und miR-130b in RXR $\alpha$ . Des Weiteren konnten mehrere Bindestellen für miR-6807 in CYP2C19 validiert werden. Von den drei untersuchten Bindestellen, war die zweite Bindestelle die sensitivste für miR-6807, da die Luciferaseaktivität des MREx3 Konstrukt stärker reduziert wurde als bei der ersten und dritten Bindestelle. Letztendlich konnten sieben von 14 vorhergesagten Bindestellen für entzündungsassoziierte miRNAs in ADME-Genen mit Luciferase-Reporter-Assays validiert werden.

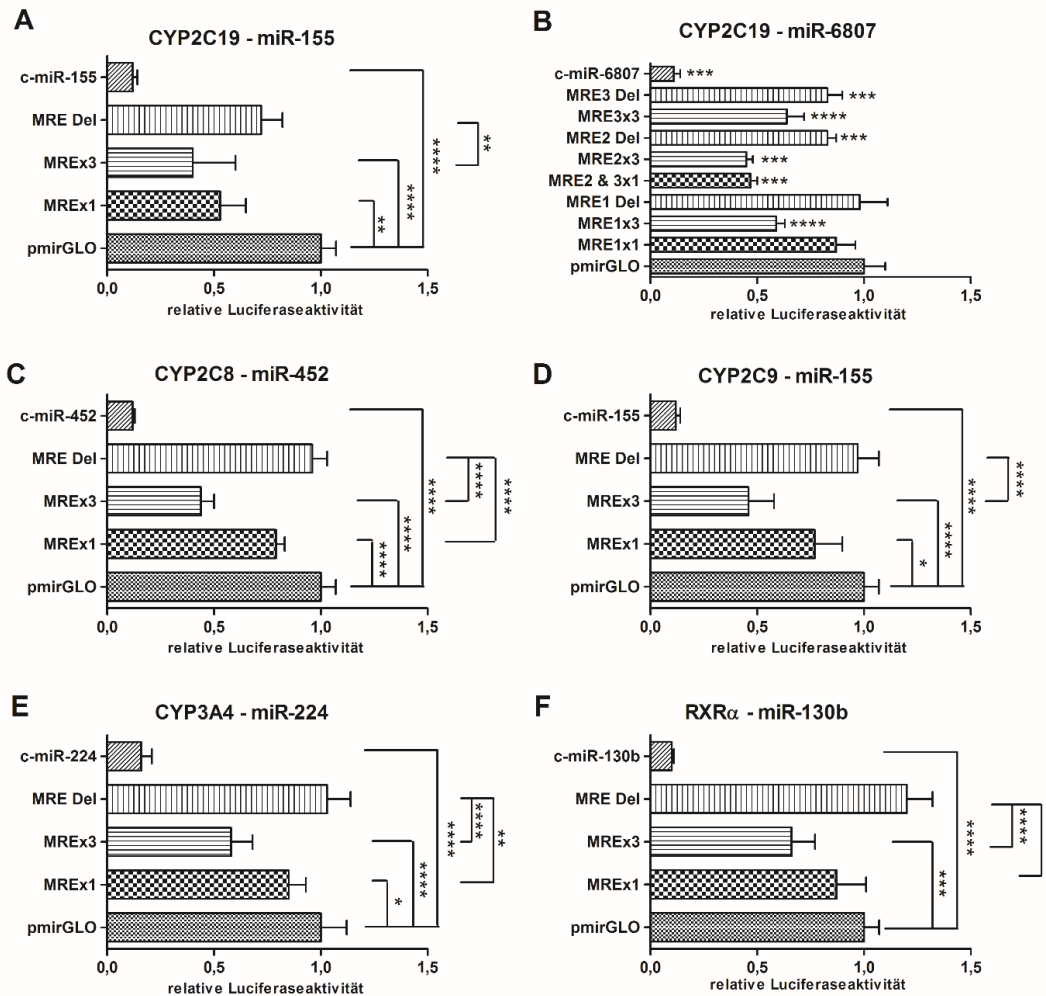
### 3. Ergebnisse

**Tab. 38: Untersuchte *in silico* vorhergesagte miRNA-Bindestellen in ADME-Genen.** *In silico* Vorhersagen (TargetScan) für relevante ADME-Targets und entzündungsassoziierte miRNAs wurden aufgrund ihres Context++ Score Perzentil (>50) und Vorkommen im Haupttranskript ausgesucht (Modifiziert aus Kugler et al. (2019)).

Target	Position in der 3'-UTR	Vorhergesagte Paarung zwischen Targetregion (oben) und miRNA (unten)	Context++ Score Perzentil
<b>CYP2B6</b> 3'-UTR Länge: 2962 bp	362-368 miR-130b-3p	5' ..CUGGGAAUACAGGCA <b>UGCACUAC</b> ..       3' UACGGGAAAGUAGUA <b>AACGUGAC</b>	84
<b>CYP2C19</b> 3'-UTR Länge: 3282 bp	329-335 miR-155-5p	5' ..AUGUUCUAAA <b>CAAAAAGCAUU</b> AU..       3' UGGGGAUAGUGCUAA <b>UCGUAAU</b>	97
	933-939 miR-543	5' ..CACUGUGCCUGGUCU <b>AAUGUUAC</b> ..       3' UUCUUCACGUGGCGC- <b>UUACAAA</b>	53
	2175-2181 miR-6807-5p	5' ..GCUGCCUGCAU <b>UCCU-UGGCUCAU</b> ..       3' GGAGAGGUAAGGUG <b>ACCGAGUG</b>	91
	2371-2377 miR-130b-3p	5' ..UGAACAA <b>CCAAACAAUUGCACUG</b> ..       3' UACGGGAAAGUAGUA <b>AACGUGAC</b>	76
	2563-2569 miR-6807-5p	5' ..GAAGAGAA <b>CUUUUUUGGCUCAC</b> ..       3' GGAGAGGUAAGGUG <b>ACCGAGUG</b>	85
	2611-2618 miR-6807-5p	5' ..CUGUUUAGAAGAU <b>ACUGGCUCA</b> A..       3' GGAGAGGUAAGGUG <b>ACCGAGUG</b>	95
<b>CYP2C8</b> 3'-UTR Länge: 2751 bp	986-992 miR-452-5p	5' ..GCACAAAGCCUCUAU <b>AAACAGUC</b> ..       3' AGUCA <b>AAAGGAGACGUUUGUCA</b> A	75
<b>CYP2C9</b> 3'-UTR Länge: 363 bp	346-352 miR-155-5p	5' ..AUGUUCUAAA <b>UAAAAAGCAUU</b> AU..       3' UGGGGAUAGUGCUAA <b>UCGUAAU</b>	97
<b>CYP3A4</b> 3'-UTR Länge: 1173 bp	610-616 miR-224-5p	5' ..GAAAGUUAAUCCACU- <b>GUGACUUU</b> ..       3' UUGCCUUGGUGAU <b>CACUGAAC</b>	91
	1137-1143 miR-452-5p	5' ..UGAACACUAAUAAA <b>AAACAGUC</b> ..       3' AGUCA <b>AAAGGAGACGUUUGUCA</b> A	93
<b>NR1I3</b> 3'-UTR Länge: 236 bp	90-97 miR-155-5p	5' ..CUGGCUGAGCUCCGG <b>AGCAUU</b> AA..       3' UGGGGAUAGUGCUAA <b>UCGUAAU</b>	98
<b>RXRA</b> 3'-UTR Länge: 3972 bp	1431-1437 miR-130b-3p	5' ..UUGAACUCGCCUCU <b>UUGCACUG</b> ..       3' UACGGGAAAGUAGUA <b>AACGUGAC</b>	51
	3877-3883 miR-155-5p	5' ..GGUUUGAU <b>GGACAGUAGCAUU</b> AG..       3' UGGGGAUAGUGCUAA <b>UCGUAAU</b>	52



### 3. Ergebnisse



**Abb. 25: Validierung von *in silico* vorhergesagten miRNA-Bindestellen in ADME-Genen.** Huh7-Zellen wurden mit Luciferase-Reporter-Plasmiden (pmirGLO, 100 ng), die verschiedene Varianten der vorhergesagte miRNA-Bindestellen (MRE) in ADME-Genen enthielten, und miRNA-Mimics (100 nM) bzw. siRNA-Kontrolle (siCTR) kotransfiziert und nach 48 h lysiert (n = 4). Als Positivkontrolle wurde die komplementäre Sequenz der jeweiligen miRNA (c-miR) verwendet. A) miR-155 Bindestelle in CYP2C19, B) miR-6807 Bindestellen in CYP2C19, C) miR-452 Bindestelle in CYP2C8, D) miR-155 Bindestelle in CYP2C9, E) miR-225 Bindestelle in CYP3A4, F) miR-130b Bindestelle in RXR $\alpha$ . Die Enzymaktivitäten der Firefly- und Renilla-Luciferasen wurden mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay System gemessen (Normalisierung der Firefly-Aktivität auf die Renilla-Aktivität, zur Kontrollbehandlung und Leervektor pmirGLO). Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001 (Modifiziert aus Kugler et al. (2019)).

#### 3.3.2 MicroRNA-Effekte auf die ADME-Genexpression

Von den 40 entzündungsassoziierten, in der Leber identifizierten miRNAs wurden fünf miRNAs zur weiteren Analyse im Zellmodell ausgewählt (Tab. 39). Diese miRNAs wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: 1. hochexprimiert in der Leber bei Patienten mit erhöhtem CRP; 2. Validierung in den Einzelleberproben durch qRT-PCR und 3. mind. zwei relevante vorhergesagte Targets (CYPs und Regulatoren wie RXR $\alpha$  und CAR) (siehe Tab. 39 und Masterarbeit Nicole Kugler, 2016). Dabei

### 3. Ergebnisse

handelte es sich um miR-155-5p, miR-224-5p, miR-452-5p, miR-543 und miR-6807-5p.

**Tab. 39: Zusammenfassung der Auswahlkriterien für die untersuchten miRNAs in HepaRG-Zellen.**

miRNA	n-fache Änderung im Vergleich zum Kontrollpool	Validierung in Lebereinzelpfen	<i>in silico</i> vorhergesagte Targets
miR-155-5p	2,64	ja	ABCB1, ABCC2, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A5, RXRA, SLC15A2, SLC22A2
miR-224-5p	13,79	ja	ABCB1, CYP3A4, SLCO1B3
miR-452-5p	5,72	ja	ABCB1, CYP2C19, CYP2C8, CYP3A4, CYP3A5, SLC22A2
miR-543	3,45	nein	ABCB1, CYP2B6, CYP2C19, CYP3A5, SLC15A2, SLC22A2, UGT2B15
miR-6807-5p	2,2	nein	CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4

Eine einzelne miRNA kann mehrere Targets angreifen und ein Target kann ein Angriffsziel für verschiedene miRNAs sein. Um die Auswirkungen der entzündungsassoziierten miRNAs auf die ADME-Genexpression und CYP-Enzymaktivitäten in Zellen zu untersuchen, wurden sogenannte miRNA-Mimics in Einzel- und Kombinationen (siehe Tab. 7) verwendet. Dies führte zu einer Überexpression der jeweiligen miRNA in den Zellen. HepaRG-Zellen wurden mit miRNA-Mimics (40 nM) für miR-155-5p, miR-224-5p, miR-452-5p, miR-543 und miR-6807-5p transfiziert und nach 72 und 96 h RNA isoliert und die Expression von 47 ADME-Genen inklusive Akut-Phase-Gene mittels qRT-PCR gemessen (Abb. 26). MiR-155 und miR-452 zeigten eine negative Regulation von CYPs auf mRNA-Ebene. Vor allem *CYP2C9* und *CYP3A4* waren stark betroffen, aber auch Phase II-Enzyme wie *GSTM1* und *UGT1A1*, Transporter wie *SLC10A1* und Regulatoren wie *NR1I3*. Interessanterweise führte miR-155 zu einer Hochregulierung von *CYP1A1*, während *CYP1A2* kaum betroffen war. Des Weiteren kam es durch miR-155 zu einer Herunterregulierung von *SOD2*. MiR-452 hatte schwache Effekte auf *ARNT*. Die Behandlung mit miR-6807 führte zu keinen signifikanten Effekten bei den untersuchten ADME-Genen. MiR-224 und miR-543 zeigten positive Auswirkungen auf *CYP3A4* (miR-224) und *CYP2C8*, *ABCC2*, *PPARA* und *NR1I2* (miR-543). MiR-155 verursachte, neben miR-452, die stärksten Effekte auf mRNA-Ebene bei ADME-Genen. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die anderen miRNAs auch Effekte auf ADME-Gene hatten, da sich miRNA-Effekte nicht unbedingt auf die mRNA Menge auswirken müssen, wenn die Proteintranslation durch die miRNA unterdrückt wird.



### 3. Ergebnisse

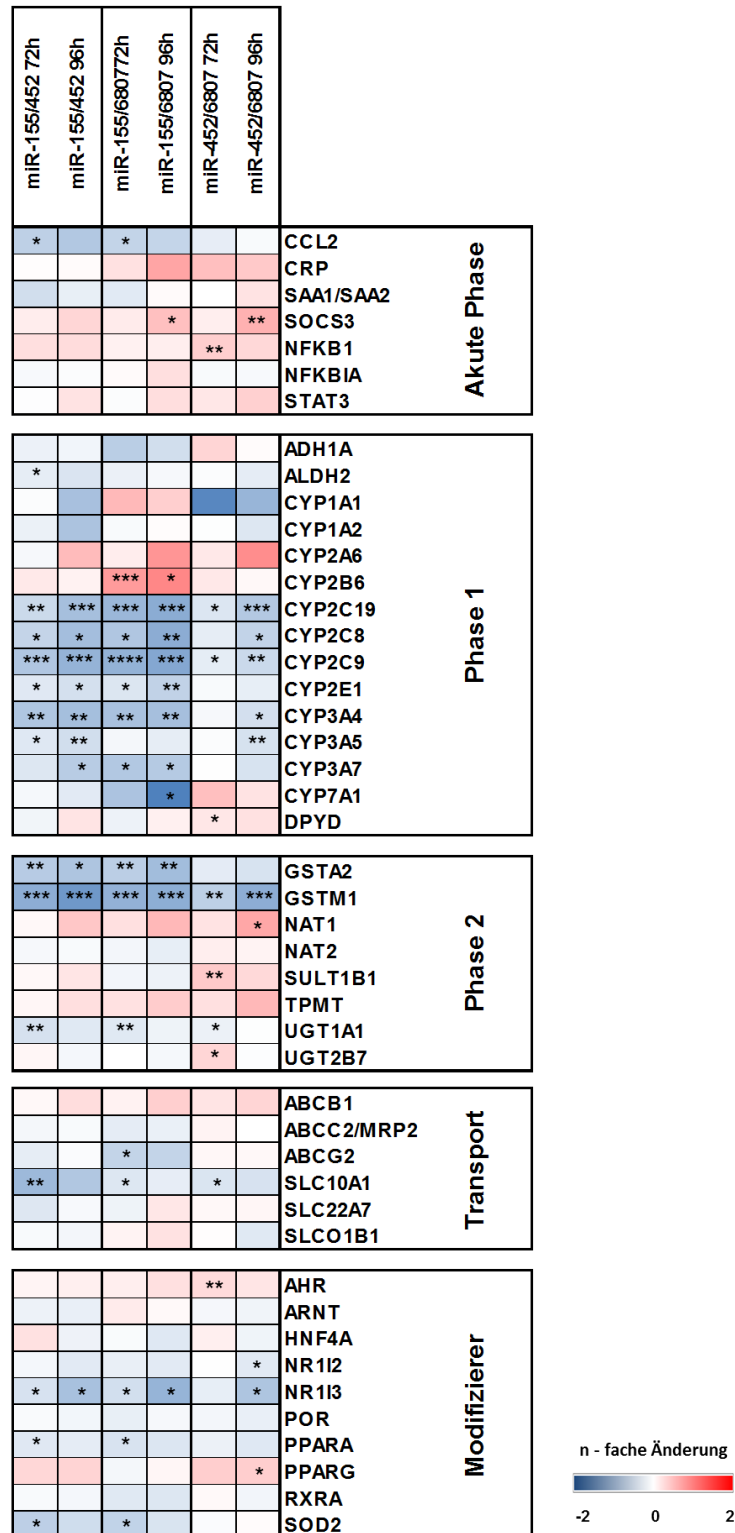
---

In HepaRG-Zellen sollte die kombinatorische Wirkung von entzündungsassoziierten miRNAs auf die ADME-Genexpression untersucht werden. Dafür wurden HepaRG-Zellen mit Kombinationen aus miRNA-Mimics (40 nM) transfiziert und nach 72 und 96 h RNA isoliert, um die Expression von 47 ADME-Genen inklusive Akut-Phase-Gene mittels qRT-PCR zu messen (Abb. 27).

Alle Kombinationen, aber vor allem die Kombinationen miR-155/miR-452 (K1) und miR-155/miR-6807 (K2), zeigten eine starke Herunterregulierung zahlreicher CYPs (außer *CYP1A1*, *1A2*, *2A6*, *2B6*). Auch Phase II-Enzyme wie *GSTA2* und *GSTM1* waren stark betroffen. K1 hatte auch eine negative Auswirkung auf *CCL2*, *SLC10A1*, *UGT1A1*, *NR1I3*, *PPARA* und *SOD2*. K2 führte nicht nur bei fremdstoffmetabolisierenden CYPs zu negativen Effekten, sondern auch bei *CYP3A7* und *CYP7A1*, die am Metabolismus von endogenen Stoffen beteiligt sind. *CYP2B6* wurde durch K2 hochreguliert. Die Kombination miR-452/miR-6807 (K3) wirkte sich positiv auf die Expression von *SOCS3*, *NFKB1*, *SULT1B1*, *PPARG*, *NAT1* aus, hatte aber allgemein eine etwas schwächere Wirkung im Vergleich zu K1 und K2. Die stärksten Wirkungen im Vergleich zu den anderen beiden Kombinationen verursachte K1.

Die Effekte der Kombinationsbehandlungen waren viel stärker als bei den jeweiligen Einzelbehandlungen, z. B. auf die meisten CYPs und *PPARA* (Abb. 26). So führte die K1 zur Abnahme von *CCL2*, während miR-155 als Einzelbehandlung keine negativen Auswirkungen hatte. *SOCS3* wurde durch K3 hochreguliert, miR-452 und miR-6807 hatten aber in den Einzelbehandlungen keine positiven Auswirkungen. *CYP1A1* wurde durch miR-155 hochreguliert, in der Kombinationsbehandlung mit miR-452 war aber eine Abnahme zu sehen. MiR-6807 hatte als Einzelbehandlung keine signifikanten Effekte. Allerdings zeigte miR-6807 in Kombination mit den anderen miRNAs eine Verstärkung der Einzelwirkungen, z. B. bei *GSTM1* und *NR1I2*. Bei miR-155 hatten miR-452 und miR-6807 eine Verstärkung der Einzelwirkung für *GSTA2*, *CYP2E1* und *CYP3A7* zur Folge. Daraus lässt sich folgern, dass miRNAs eine kombinatorische Wirkung auf die ADME-Genexpression haben können.

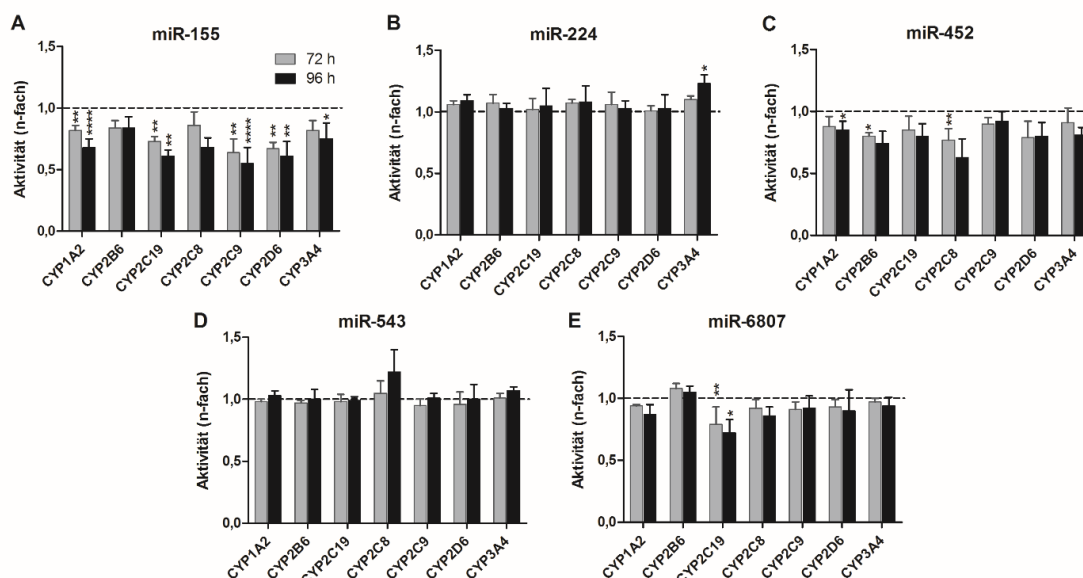
### 3. Ergebnisse



**Abb. 27: Einfluss von miRNA-Kombinationen auf die ADME-Genexpression durch Überexpression.** HepaRG-Zellen wurden mit Kombinationen aus miRNA-Mimics (40 nM) und siRNA-Kontrolle (siCTR) transfiziert und nach 72 und 96 h lysiert (n = 3). Die Messung der ADME-Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Fluidigm, Normalisierung auf *GAPDH* und siCTR). Die Heatmap zeigt die n-fachen Änderungen ( $\log_2$ ) relativ zur siRNA-Kontrolle. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

### 3.3.3 MicroRNA-Effekte auf die Cytochrom-P450-Enzymaktivität

HepaRG-Zellen wurden mit miRNA-Mimics (40 nM) für miR-155-5p, miR-224-5p, miR-452-5p, miR-543 und miR-6807-5p transfiziert und nach 72 und 96 h die CYP-Enzymaktivität mittels des CYP-Cocktail-Assays analysiert (Abb. 28).



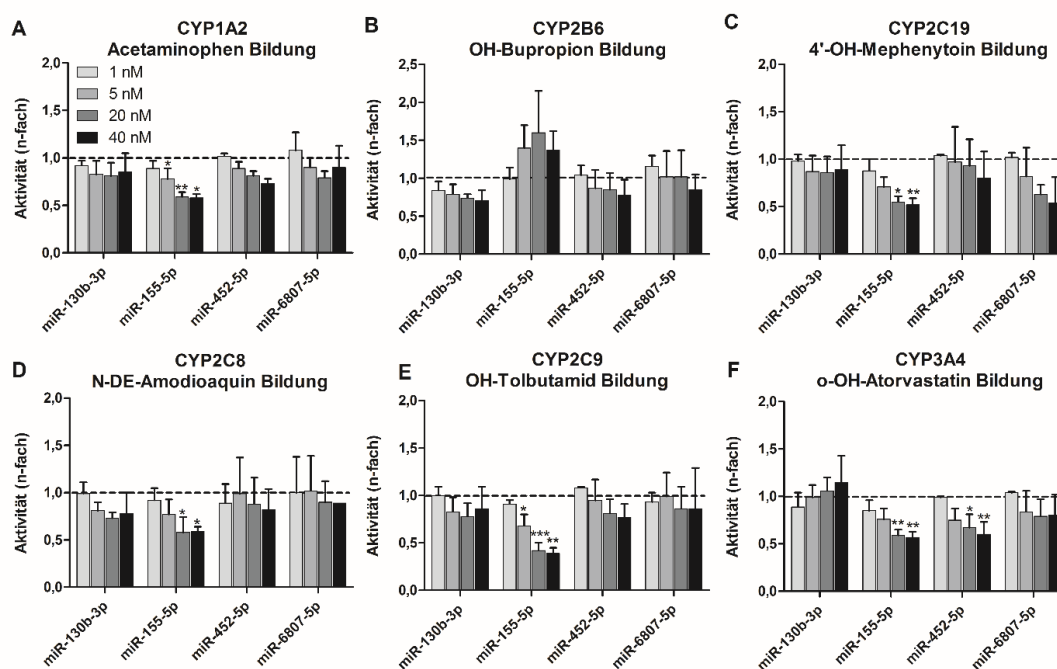
**Abb. 28: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf CYP-Enzymaktivitäten durch Überexpression.** HepaRG-Zellen wurden mit miRNA-Mimics für A) miR-155, B) miR-224, C) miR-452, D) miR-543, E) miR-6807 (40 nM) und siRNA-Kontrolle (siCTR) transfiziert und nach 72 miRNA und 96 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (n = 3). Die Bildung der Metabolite Acetaminophen (CYP1A2), OH-Bupropion (CYP2B6), 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), OH-Tolbutamid (CYP2C9) und o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zur siRNA-Kontrolle dargestellt. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001 (Modifiziert aus Kugler et al. (2019)).

Die Transfektion von miR-155 hatte negative Auswirkungen auf die Enzymaktivitäten von CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9 und CYP3A4. Die stärkste Auswirkung von miR-155 war auf die CYP2C9 Aktivität zu sehen (Abnahme um ca. 50 % nach 96 h). MiR-224 zeigte eine positive Auswirkung auf CYP3A4, aber sonst keine weiteren Effekte. MiR-452 führte zu negativen Auswirkungen auf CYP1A2, CYP2B6 und CYP2C8. MiR-543 hatte keine signifikanten Auswirkungen auf CYP-Enzymaktivitäten. MiR-6807 hingegen hatte negative Auswirkungen auf CYP2C19 (Abnahme um 30 %). Somit zeigte miR-155 insgesamt breitgefächerte Wirkungen und die stärksten Effekte auf die CYP-Enzymaktivität, während miR-452 geringe Effekte auf wenige CYPs hatte.

Um zu überprüfen, ob diese miRNAs auch bereits bei niedrigeren Konzentrationen Effekte aufweisen und eine dosisabhängige Regulation von CYP-Enzymaktivitäten

### 3. Ergebnisse

zeigen, wurden HepaRG-Zellen mit verschiedenen miRNA-Mimic-Konzentrationen (1, 5, 20 und 40 nM) der entzündungsassoziierten miRNAs titriert und nach 96 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (Abb. 29). Dafür wurden miR-155-5p, miR-452-5p und miR-6807-5p verwendet, da sie bereits Effekte auf CYP-Aktivitäten gezeigt hatten. MiR-130b-3p, als eine bereits bekannte entzündungsassoziierte miRNA, wurde zusätzlich untersucht.

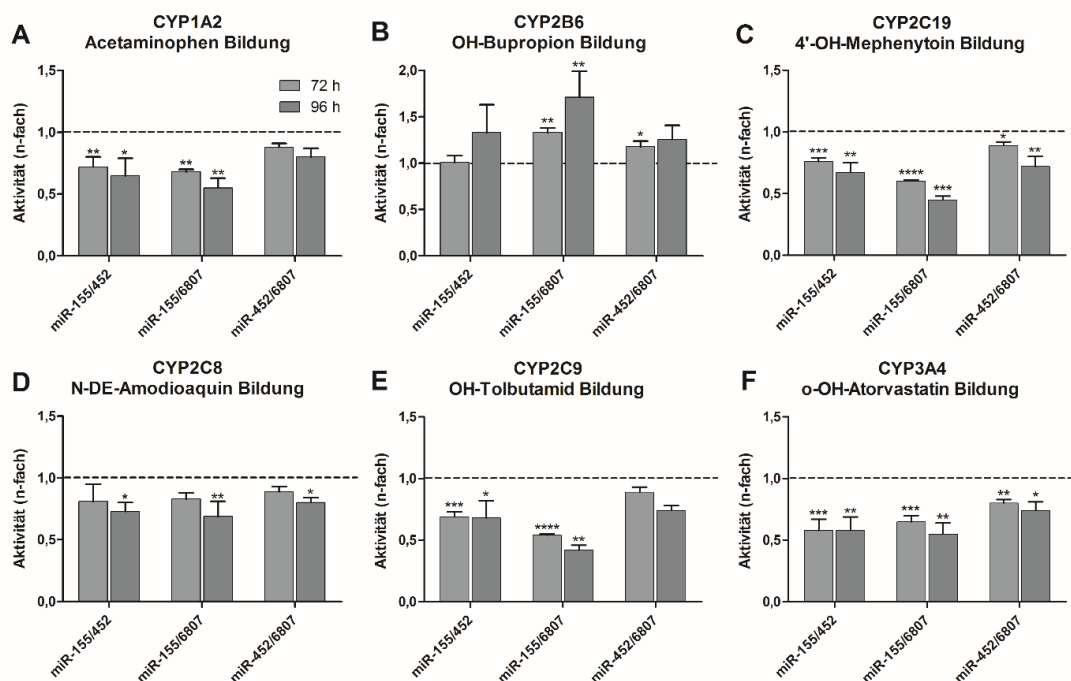


**Abb. 29: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf CYP-Enzymaktivitäten durch Titration.** HepaRG-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an miRNA-Mimics (1, 5, 20 und 40 nM) und siRNA-Kontrolle (siCTR) transfiziert und nach 96 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (n = 3-4). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9) und F) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zur siRNA-Kontrolle dargestellt. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

MiR-155 zeigte konzentrationsabhängige Effekte auf die Aktivität von CYP1A2, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9 und CYP3A4. Dies galt auch für miR-452 bei CYP1A2 und CYP3A4; miR-130b bei CYP2B6 und CYP2C8; miR-6807 nur bei CYP2C19. MiR-155 zeigte wenige Effekte bereits bei 1 nM, aber dafür schon bei 5 und 20 nM. Eine Konzentration von 5 nM führte bei miR-452 zu ersten Effekten. MiR-130b zeigte für wenige CYPs eine Wirkung bei 1 nM, für 5 nM aber stärkere Effekte. Eine Transfektion von miR-6807 führte erst ab 20 nM zu Effekten. MiR-155 war somit die potenteste miRNA, die bereits bei geringen Konzentrationen zu einer Regulation von vielen CYPs führte.

### 3. Ergebnisse

Um die Auswirkungen von miRNA-Kombinationen auch auf CYP-Enzymaktivitäten zu analysieren, wurden neben der ADME-Genexpression (Abb. 27) die CYP-Enzymaktivitäten nach 72 und 96 h gemessen (Abb. 30).



**Abb. 30: Einfluss von miRNA-Kombinationen auf CYP-Enzymaktivitäten durch Überexpression.** HepaRG-Zellen wurden mit Kombinationen aus miRNA-Mimics (40 nM) und siRNA-Kontrolle (siCTR) transfiziert und nach 72 und 96 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (n = 3). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9) und F) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zur siRNA-Kontrolle dargestellt. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

Die Kombination miR-155/6807 (K2) führte zu additiven Effekten bei CYP1A2 (Abnahme durch K2 um 43 %, Abnahme aus Summe der Einzelbehandlungen 45 %) und CYP2C9 (Abnahme durch K2 um 56 %, Abnahme aus Summe der Einzelbehandlungen 52 %). Für CYP2C19 wies K2 eine stärkere Wirkung als die Einzelbehandlungen auf. Geringere Effekte waren hingegen für CYP2B6 für K1 und K2 zu sehen. MiR-155 und miR-452 verstärkten den positiven Effekt von miR-6807 und auch als gemeinsame Kombination hatten sie einen positiven Effekt auf CYP2B6. Bei CYP3A4 führten alle miRNA-Kombinationen zu einer weiteren Abnahme der Enzymaktivität. K2 verursachte bei CYP3A4 sogar synergistische Effekte, da die Abnahme (um 40 %) größer war als die Summe der Einzelbehandlungen (um 33 %). K2 verursachte insgesamt die stärksten Effekte, die jedoch vom Isoenzym abhängig waren (vor allem CYP2C19 und CYP2C9). Die Kombination mit den schwächsten

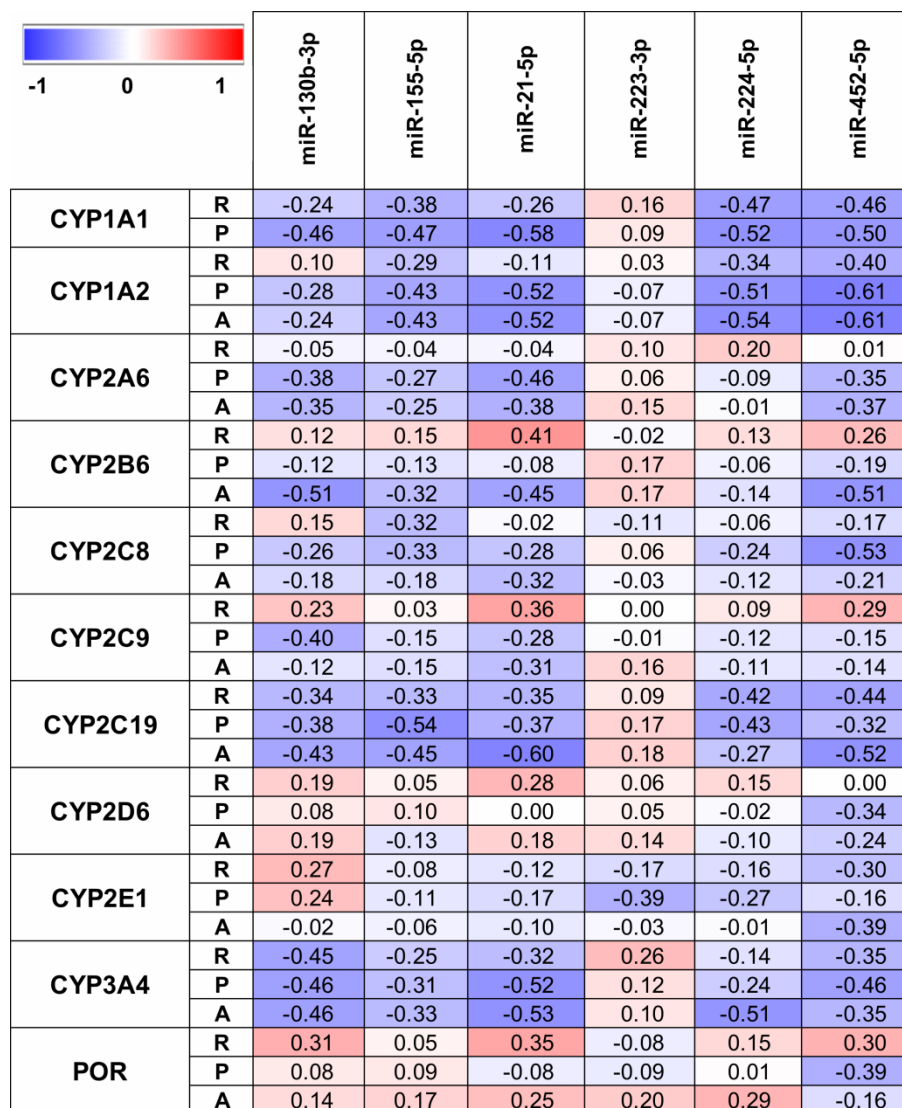


Effekten war K3 mit miR-452/6807. Kombinationen aus miRNAs können somit die Einzelwirkungen der jeweiligen miRNAs verstärken.

#### **3.3.4 Korrelationen von entzündungsassoziierten microRNAs mit ADME-Genen**

Es waren bereits durch eine Microarray-Analyse 40 entzündungsassoziierte miRNAs bzw. 25 Cholestase-assoziierte miRNAs in gepoolten Leberproben von Patienten ( $n = 7$ ) mit erhöhtem Entzündungsmarker CRP bzw. Cholestase-Patienten ( $n = 17$ ) im Vergleich zu einem Kontrollpool ( $n = 10$ ) identifiziert worden. Ebenso waren sechs ausgewählte entzündungsassoziierte miRNAs in den Lebereinzelpollen mittels qRT-PCR validiert worden (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016). Um den möglichen Einfluss von miRNAs *in vivo* zu untersuchen, wurden statistische Korrelationen zwischen der Expression der ausgewählten miRNAs in den Lebereinzelpollen (aus CRP, Cholestase und Kontrollpool,  $n = 34$ ) und den bereits vorliegenden korrespondierenden CYP-Daten (Gen- und Proteinexpression sowie Enzymaktivität) durchgeführt. In Abb. 31 sind die Korrelationen mit CYPs und POR auf Gen-, Protein- und Aktivitätsebene dargestellt. Einige Korrelationen zwischen der miRNA-Expression und CYPs waren negativ. Nur POR zeigte für fast alle miRNAs positive Korrelationen. MiR-223-3p zeigte keine hohen Korrelationen zu CYPs. Die höchste positive Korrelation mit  $r_s = 0,41$  war für CYP2B6 und miR-21 auf RNA Ebene zu sehen, während CYP1A2 und miR-452 auf Protein- und Aktivitätsebene die höchste negative Korrelation mit  $r_s = -0,61$  hatten. Eine negative bzw. inverse Korrelation könnte ein Anzeichen dafür sein, dass miRNAs diese ADME-Gene *in vivo* negativ regulieren.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 31: Heatmap der Korrelationsanalyse zwischen miRNA-Expression und CYP/POR Phänotypen.** Zeilen zeigen Expression der mRNA (R), des Proteins (P) und der Enzymaktivität (A) der wichtigsten CYPs und POR. Spearman-Korrelationskoeffizienten  $r_s$  sind mit dazugehöriger Farbskala dargestellt (Kugler et al. 2019).

#### 3.4 Herkunft von entzündungsassoziierten microRNAs

Da Lebergewebe nicht nur aus Hepatozyten besteht, sondern auch aus Kupferzellen und weiteren Immunzellen, können die identifizierten entzündungsassoziierten miRNAs in Hepatozyten oder auch Immunzellen durch entzündliche Bedingungen induziert worden sein. Außerdem könnte es sich auch um miRNAs aus der systemischen Zirkulation handeln. Daher sollte durch verschiedene Untersuchungen analysiert werden, ob die entzündungsassoziierten miRNAs aus Hepatozyten stammten.

### 3.4.1 Induzierbarkeit von microRNAs durch Cytokine in HepaRG-Zellen

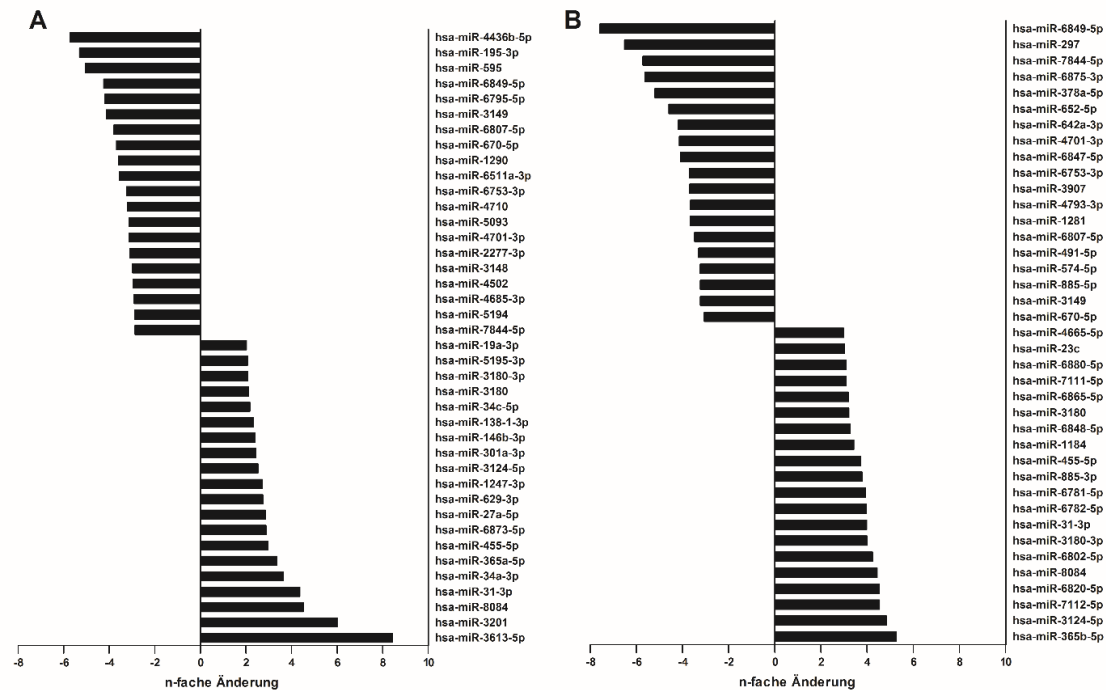
Die Induzierbarkeit bzw. Deregulierung von miRNAs durch entzündliche Mediatoren wie Cytokine sollte in Hepatozyten untersucht werden. Dafür wurden HepaRG-Zellen mit IL-6 (10 ng/ml) und IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) als die bedeutendsten Cytokine in der APR und dem Lösungsmittel als Kontrolle für 24 h behandelt und mithilfe von speziellen miRNA-Microarrays die miRNA-Expression ermittelt.

**Tab. 40: Verteilung von differenziell exprimierten miRNAs in cytokinbehandelten HepaRG-Zellen.** HepaRG-Zellen wurden für 24 h mit IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) und mit dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Um die miRNA-Expression zu messen, wurden Microarray-Analysen mit Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Arrays durchgeführt. Die Zahl der deregulierten miRNAs bei verschiedenen Schwellwerten ist dargestellt (Signalintensität war >5 in einer der Behandlungsgruppen).

n-fache Änderung	IL-6	IL-1 $\beta$
>1,5	76	124
>2	21	59
>3	6	19
> 5	2	1
<-1,5	101	118
<-2	45	54
<-3	15	20
<-5	3	5
<b>Gesamt</b>	<b>177</b>	<b>242</b>

IL-6-behandelte HepaRG-Zellen wiesen weniger hochregulierte als herunterregulierte miRNAs (76 vs. 101 miRNAs) auf, während IL-1 $\beta$ -behandelte Zellen eine höhere Anzahl an hochregulierten miRNAs aufwiesen (124 vs. 118 miRNAs) (Tab. 40). Somit besaßen IL-1 $\beta$ -behandelte HepaRG-Zellen die meisten deregulierten miRNAs im Vergleich zu IL-6-behandelten Zellen (242 vs 177 miRNAs). Die Regulation der miRNAs war damit abhängig vom jeweiligen Cytokin. Unter den Top 20 regulierten miRNAs zeigte miR-3613-5p die höchste Expressionssteigerung (max. 8,41-fach), während miR-4436b-5p die höchste Herunterregulierung (-5,71-fach) bei IL-6-behandelten Zellen aufwies (Abb. 32). Bei IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen war miR-365b-5p die höchste hochregulierte miRNA (5,26-fach) und miR-6849-5p die höchste herunterregulierte miRNA (-7,59-fach) bei den Top 20 regulierten miRNAs.

### 3. Ergebnisse

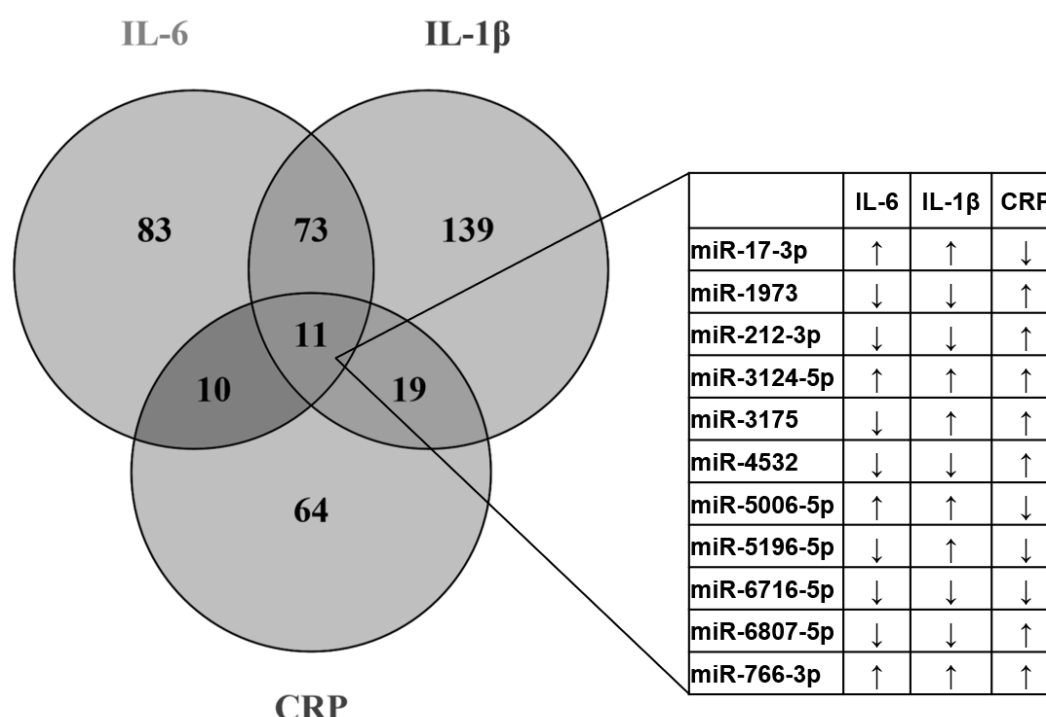


**Abb. 32: Einfluss von Cytokinen auf die miRNA-Expression in HepaRG-Zellen.** Die Top 20 hoch- und herunterregulierten miRNAs nach 24 h in A) IL-6 (10 ng/ml) und B) IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) behandelten HepaRG-Zellen sind im Vergleich zu kontrollbehandelten HepaRG-Zellen dargestellt (miRNA war mindestens in einer Behandlungsgruppe exprimiert). Um die miRNA-Expression zu messen, wurden Microarray-Analysen mit Affymetrix GeneChip $^{\circledR}$  miRNA 4.0 Arrays durchgeführt.

Die miRNA-Expression in gepoolten Leberproben von Patienten ( $n = 7$ ) mit erhöhtem Entzündungsmarker CRP war bereits im Vergleich zu einem Kontrollpool ( $n = 10$ ) untersucht worden (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016). Nun sollte analysiert werden, ob es eine Überlappung zwischen den in den Leberproben bzw. HepaRG-Zellen gefundenen miRNAs gab, um entzündungsassoziierte miRNAs zu identifizieren, die aus Hepatozyten stammten. Im Venndiagramm in Abb. 33 sind die Schnittmengen (n-fache Änderung  $\pm 1,5$  zur Kontrolle, miRNA-Expression in mind. einer Behandlungsgruppe) zwischen IL-6 bzw. IL-1 $\beta$ -behandelten HepaRG-Zellen und den gepoolten Leberproben dargestellt. Alle drei Gruppen besaßen 11 gemeinsame miRNAs wie z. B. miR-6807-5p und miR-17-3p. Die größte Überschneidung war mit 84 gemeinsamen miRNAs (47,5 % von 177 miRNAs bzw. 34,7 % bei 242 miRNAs) zwischen IL-6- und IL-1 $\beta$ -behandelten HepaRG-Zellen zu sehen. Die gepoolten Leberproben hingegen zeigten nur 21 gemeinsame miRNAs (20,2 % von 104 miRNAs) mit IL-6-behandelten HepaRG-Zellen und 30 gemeinsame miRNAs (28,8 %) mit IL-1 $\beta$ -behandelten HepaRG-Zellen. Berücksichtigt man die differenzielle Expression der 11 gemeinsamen miRNAs in den einzelnen Gruppen, wiesen die miRNAs in IL-6- und IL-1 $\beta$ -behandelten HepaRG-Zellen teilweise eine ähnliche n-

### 3. Ergebnisse

fache Änderung auf, während sich die miRNAs in der CRP Gruppe teilweise entgegengesetzt verhielten (Tab. 41). Nur miR-6716-5p, miR-766-3p und miR-3124-5p zeigten in allen drei Gruppen eine gemeinsame Hoch- bzw. Herunterregulierung. Demnach wurden nur wenige gemeinsame entzündungsassoziierte miRNAs identifiziert, die ein zum Teil gegenteiliges Verhalten unter entzündlichen Bedingungen aufwiesen. Somit scheint eine andere miRNA-Population unter definierten Bedingungen (Cytokine) in Hepatozyten (HepaRG-Zellen) im Vergleich zu Lebergewebe bei einem erhöhten CRP vorzuliegen.



**Abb. 33: Überschneidung von differenziell exprimierten miRNAs in IL-6/IL-1β-behandelten HepaRG-Zellen und gepoolten Leberproben von Patienten mit erhöhtem CRP.** HepaRG-Zellen wurden für 24 h mit IL-6 (10 ng/ml) bzw. IL-1β (5 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt. Gepoolte Leberproben von Patienten mit erhöhtem CRP (n = 7, CRP >10 mg/l) wurden mit gepoolten Leberproben von Patienten mit normalem CRP (n = 10, CRP <10 mg/l) verglichen. Um die miRNA-Expression zu messen, wurden Microarray-Analysen mit Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Arrays durchgeführt. Die n-fache Änderung im Vergleich zu den Kontrollen betrug  $\pm 1,5$  für alle miRNAs und die Signalintensität war mindestens >5 in einer Vergleichsgruppe. Diagramm wurde mit Venny 2.1 gezeichnet.

Die gemeinsamen 11 miRNAs wiesen allerdings einige Bindestellen in den untersuchten 35 ADME-Genen auf (Tab. 41). Dabei war SLCO1B3 das häufigste vorhergesagte ADME-Gen (für 7 miRNAs), gefolgt von RXRA (6) und CYP2B6 (6). MiRNA-5196-5p hatte die meisten Targets in ADME-Genen (11). MiR-766-3p scheint eine entzündungsrelevante miRNA zu sein, da sie in allen Gruppen hochreguliert war und einige CYPs und Transporter sowie RXR $\alpha$  als Targets besitzt.

### 3. Ergebnisse

**Tab. 41: Übersicht über gemeinsame miRNAs der gepoolten Leberproben sowie IL-6 und IL-1 $\beta$ -behandelten HepaRG-Zellen.** MiRNAs sind mit der n-fachen Änderung in der jeweiligen Gruppe dargestellt mit dazugehörigen Targetvorhersagen in ADME-Genen (TargetScan).

miRNA	IL-6	IL-1 $\beta$	CRP	ADME-Targets
miR-17-3p	1,83	2,55	-1,55	SLC15A2, SLC22A1, SLCO1B3, SULT1A1, TPMT, UGT1A1, UGT1A3
miR-1973	-1,77	-1,9	2,49	POR
miR-212-3p	-1,64	-1,55	3,31	ABCG2, RXRA, SLC15A2
miR-3124-5p	2,52	4,83	1,55	keine ADME-Targets
miR-3175	-1,89	1,79	2,17	ABCG2, CYP2B6, RXRA, SLC22A2, SLCO1B3, TPMT
miR-4532	-1,88	-1,63	1,88	CYP2B6, RXRA, SLC15A2, SULT1A1
miR-5006-5p	1,88	2,83	-1,69	ABCC2, CYP1A2, POR
miR-5196-5p	-1,66	2,21	-2,62	ABCG2, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C8, CYP2C9, GSTM1, RXRA, SLC22A6, SLCO1B3
miR-6716-5p	-2,15	-1,56	-1,57	ABCG2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2C8, CYP3A5, GSTM1, SLCO1B3, TPMT, UGT1A1, UGT1A3
miR-6807-5p	-3,79	-3,47	2,2	CYP2B6, CYP2C19, CYP3A4, RXRA, SLC15A2, SLC22A1, SLCO1B3, SULT1A1
miR-766-3p	1,54	1,54	2,24	ABCG2, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, RXRA, SLC15A2, SLCO1B3

#### 3.4.2 Regulation von funktionalen microRNA-Bindestellen in ADME-Genen durch cytokininduzierte microRNAs

Um die Herkunftsfrage der entzündungsassoziierten miRNAs weiter zu klären, sollte in hepatischen Zellmodellen überprüft werden, ob cytokininduzierte miRNAs in der Lage sind die validierten miRNA-Bindestellen in ADME-Genen negativ zu regulieren.

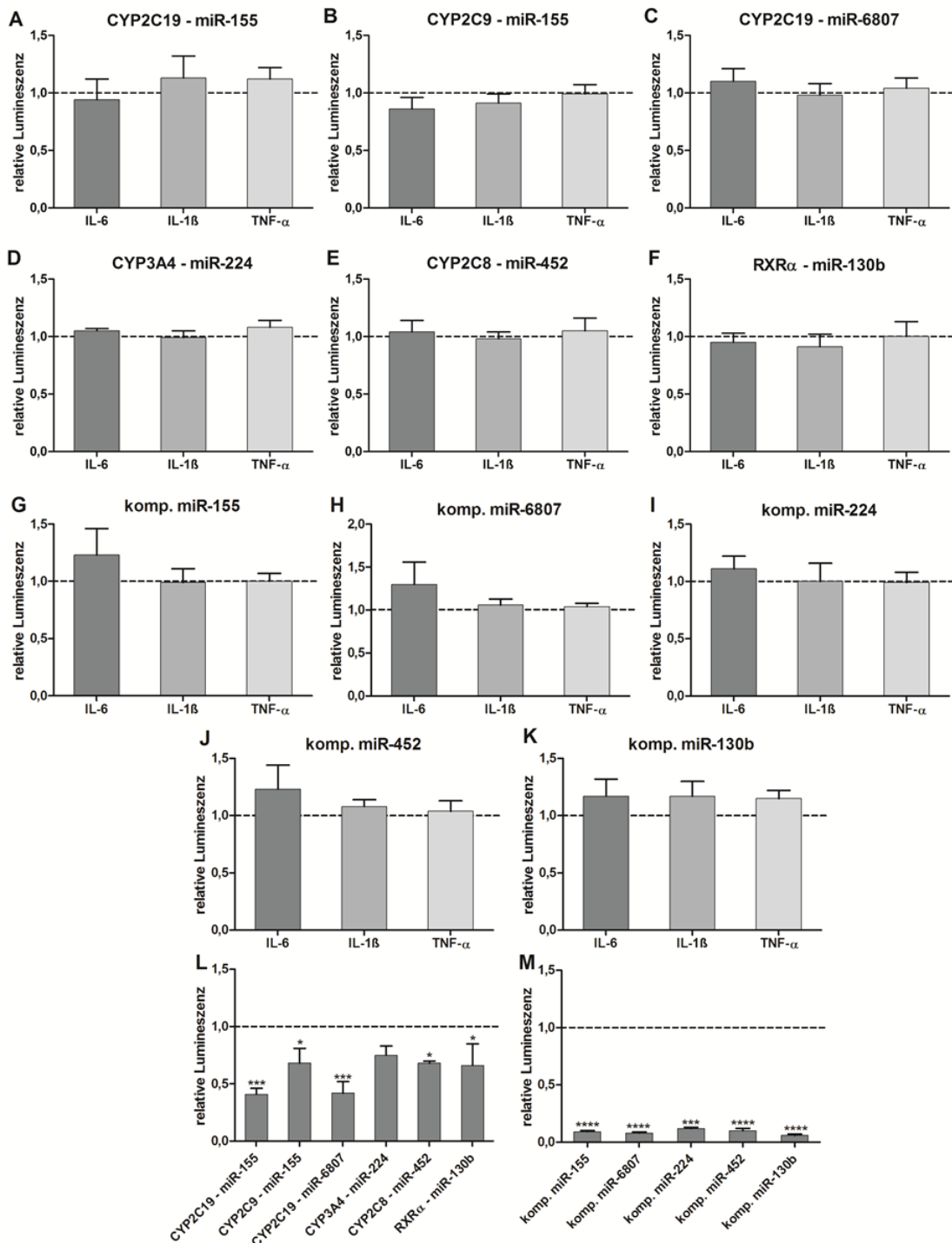
Aufgrund der besseren Transfizierbarkeit im Vergleich zu HepaRG-Zellen wurden für diese Experimente sowohl Huh7 als auch HepG2-Zellen untersucht, um zwei unterschiedliche Leberzellmodelle zu analysieren. Dabei wurde die Induktion der miR-130b, miR-155, miR-224, miR-452 und miR-6807 durch die Cytokine IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) mithilfe der validierten Bindestellen in CYP2C19, CYP2C9, CYP2C8, CYP3A4 und RXR $\alpha$  und den Positivkontrollen (komp. miRNAs) überprüft (Abb. 34A-K und Abb. 35A-K). Die Behandlungen mit miRNA-Mimics führten zu den erwarteten Abnahmen der Luciferaseaktivität (Abb. 34L-M und Abb. 35L-M). In beiden Zellmodellen kam es bei keiner der Cytokinbehandlungen zu einer signifikanten Reduzierung der Luciferaseaktivität. Dies war auch bei den Positivkontrollen der Fall. Somit kam es zu keiner miRNA-Bindung an die Bindestellen und höchstwahrscheinlich keiner Induktion der untersuchten miRNAs in Huh7- und HepG2-Zellen. Allerdings können Huh7- und HepG2-Zellen als Leberkarzinomzelllinien eine andere induzierbare miRNA-Population als gesunde

### 3. Ergebnisse

---

Hepatozyten ausweisen. Daher sollten in weiteren Analysen die endogene Funktion der entzündungsassoziierten miRNAs in HepaRG-Zellen überprüft werden.

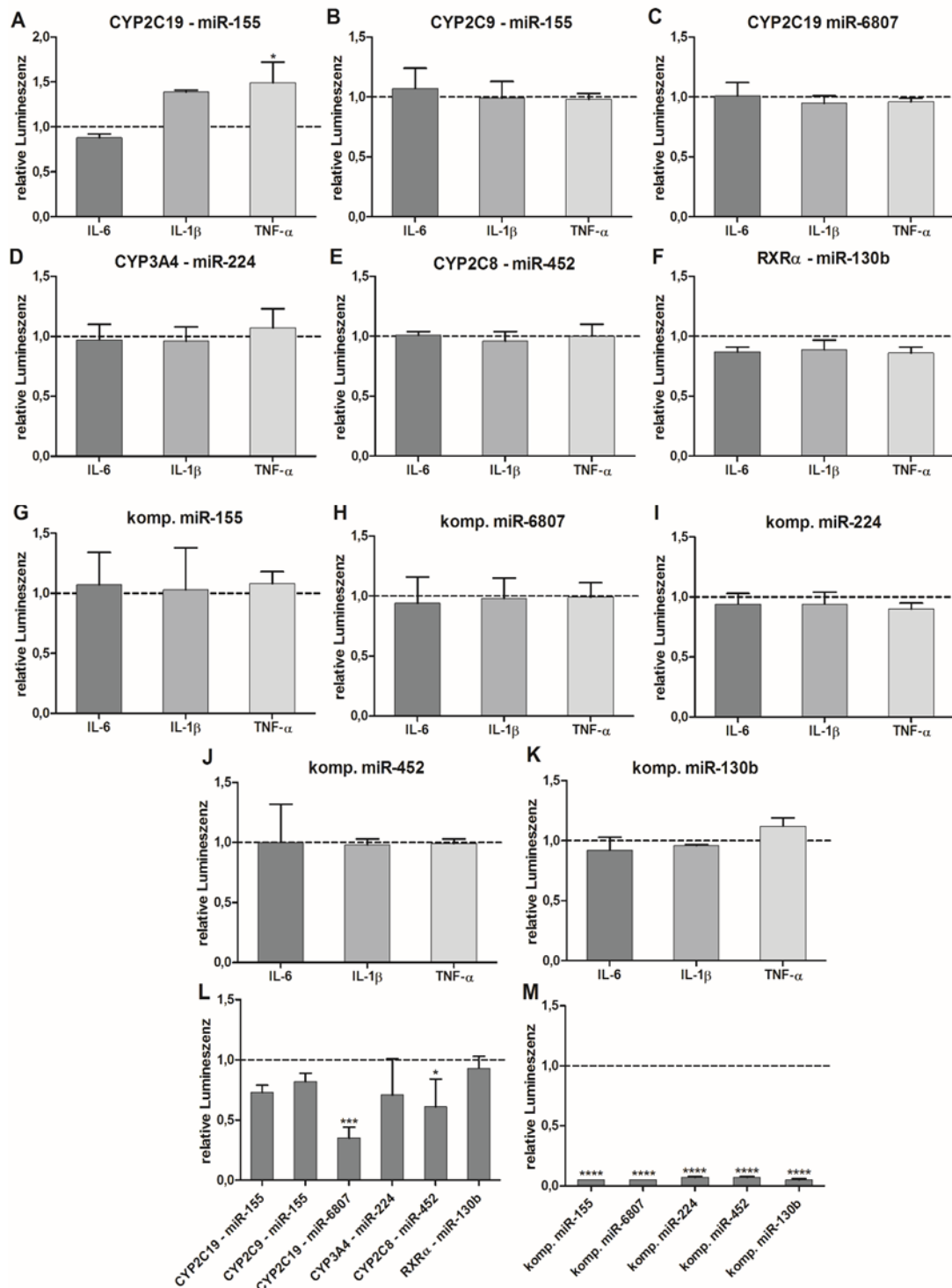
### 3. Ergebnisse



**Abb. 34: Validierte miRNA-Bindestellen unter Cytokineinfluss in Huh7-Zellen.** Huh7-Zellen wurden mit Luciferase-Reporter-Vektoren (pmirGLO, 100 ng), die vorhergesagte miRNA-Bindestellen A)-F) in ADME-Genen bzw. die komplementäre Sequenz der miRNA G)-K) enthielten, transfiziert sowie mit den Cytokinen IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml) bzw. TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und nach 48 h lysiert (n = 3). L) und M) zeigen Behandlungen mit miRNA-Mimics (Konstrukt wurde mit jeweiliger miRNA-Mimic kotransfiziert im Vergleich zur Kontrollbehandlung). Die Enzymaktivitäten der Firefly- und Renilla-Luciferasen wurden mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay System gemessen (Normalisierung der Firefly-Aktivität auf Renilla-Aktivität, zur Kontrollbehandlung und Leervektor pmirGLO). Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.



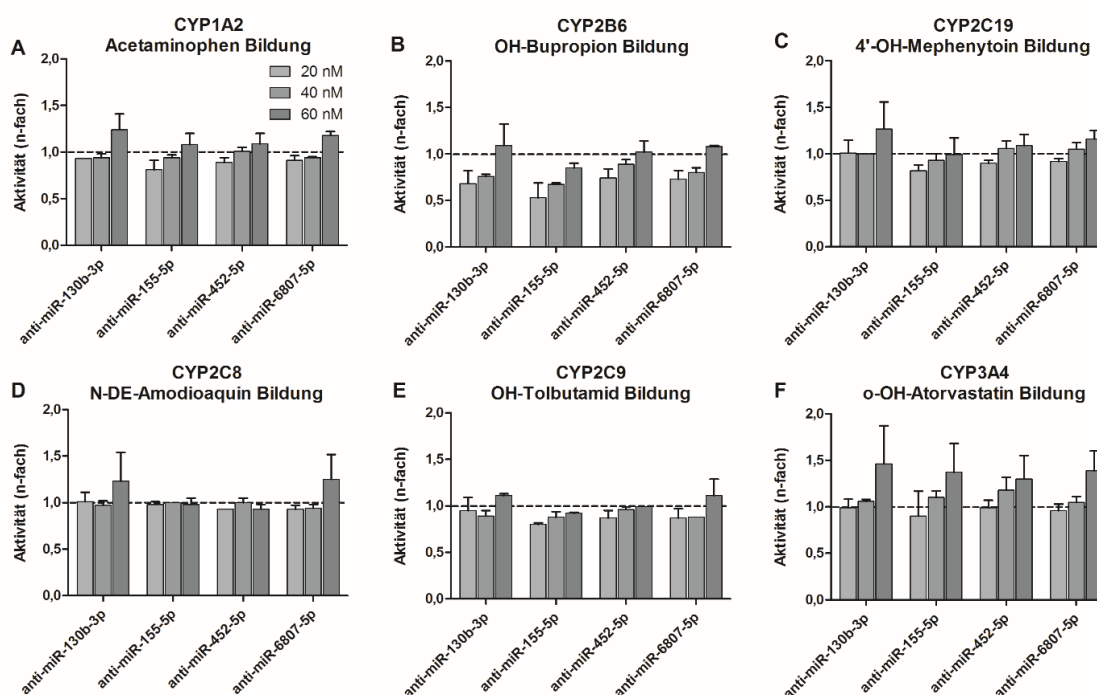
### 3. Ergebnisse



**Abb. 35: Validierte miRNA-Bindestellen unter Cytokineinfluss in HepG2-Zellen.** HepG2-Zellen wurden mit Luciferase-Reporter-Vektoren (pmirGLO, 100 ng), die vorhergesagte miRNA-Bindestellen A)-F) in ADME-Genen bzw. die komplementäre Sequenz der miRNA G)-K) enthielten, transfiziert sowie mit den Cytokinen IL-6 (10 ng/ml), IL-1β (5 ng/ml) bzw. TNF-α (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und nach 48 h lysiert (n = 3). L) und M) zeigen Behandlungen mit miRNA-Mimics (Konstrukt wurde mit jeweiliger miRNA-Mimic kotransfiziert im Vergleich zur Kontrollbehandlung). Die Enzymaktivitäten der Firefly- und Renilla-Luciferasen wurden mit dem Dual-Luciferase-Reporter-Assay System gemessen (Normalisierung der Firefly-Aktivität auf Renilla-Aktivität, zur Kontrollbehandlung und Leervektor pmirGLO). Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

### 3.4.3 Inhibierung der endogenen microRNA-Funktion durch Antagomir-Transfektionen

Um die Funktion der entzündungsassoziierten miRNAs weiter zu untersuchen, wurden Antagomir-Transfektionen in HepaRG-Zellen durchgeführt. Dadurch sollte die endogene Funktion der jeweiligen miRNA inhibiert werden und eine Zunahme des Targets zu beobachten sein. Dafür wurden HepaRG-Zellen mit verschiedenen miRNA-Antagomir-Konzentrationen (20, 40 und 60 nM) behandelt und die CYP-Aktivität mittels CYP-Cocktail-Assay nach 96 h getestet (Abb. 36). Die miRNA-Antagomir-Transfektionen wurden nur für miRNAs durchgeführt, bei denen miRNA-Mimic-Behandlungen Effekte gezeigt hatten (miR-155, miR-452 und miR-6807). Die Transfektion der gewählten Antagomirs hatte keine positive Auswirkung auf die CYP-Aktivitäten, unabhängig von ihrer Konzentration. Nur bei CYP2B6 waren bei niedrigen Konzentrationen negative Auswirkungen sichtbar. Wahrscheinlich war die endogene miRNA-Expression zu niedrig gewesen, um Effekte zu sehen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die entzündungsassoziierten miRNAs erst durch Cytokine induziert werden müssen, um eine negative Wirkung auf ADME-Gene zu haben.



**Abb. 36: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf CYP-Enzymaktivitäten durch Inhibierung.** HepaRG-Zellen wurden mit verschiedenen Mengen an miRNA-Antagomirs (20, 40 und 60 nM) und siRNA-Kontrolle (siCTR) transfiziert und nach 96 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (n = 2). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9) und F) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zur siRNA-Kontrolle dargestellt.

#### **3.4.4 Inhibierung der endogenen microRNA-Funktion durch Acriflavin**

Um den Einfluss aller entzündungsassoziierten miRNAs bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung in Hepatozyten zu untersuchen, wurde AF als ein Inhibitor der endogenen miRNA-Funktion verwendet. Der Stoff war bei einem Screening für miRNA-Biogenese-Inhibitoren identifiziert worden. Angeblich soll dieser Stoff verhindern, dass miRNAs in den RISC geladen werden und miRNAs an die mRNA binden können (Watashi et al. 2010; Lauschke et al. 2016). AF könnte somit eine Abschätzung des Beitrages endogener miRNAs bei der negativen Akut-Phase-Reaktion in Hepatozyten ermöglichen, indem man in HepaRG-Zellen den Einfluss von proinflammatorischen Cytokinen auf den Arzneistoffmetabolismus mit und ohne AF vergleicht. Sollten endogene miRNAs hier einen Einfluss haben, würde man mit AF eine geringere Herunterregulierung der ADME-Gene unter Cytokinbehandlung erwarten.

##### **3.4.4.1 Auswirkungen von Acriflavin auf die Akut-Phase-Reaktion**

HepaRG-Zellen wurden mit Kombinationen aus Acriflavin (2  $\mu$ M) sowie den Cytokinen IL-6 (10 ng/ml), IL-1 $\beta$  (5 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt, um eine APR auszulösen und gleichzeitig den Einfluss von miRNAs zu unterbinden. Die APR unter AF wurde mit der normalen APR verglichen.

##### ***3.4.4.1.1 Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Acriflavin und Cytokinen auf die CYP-Enzymaktivität***

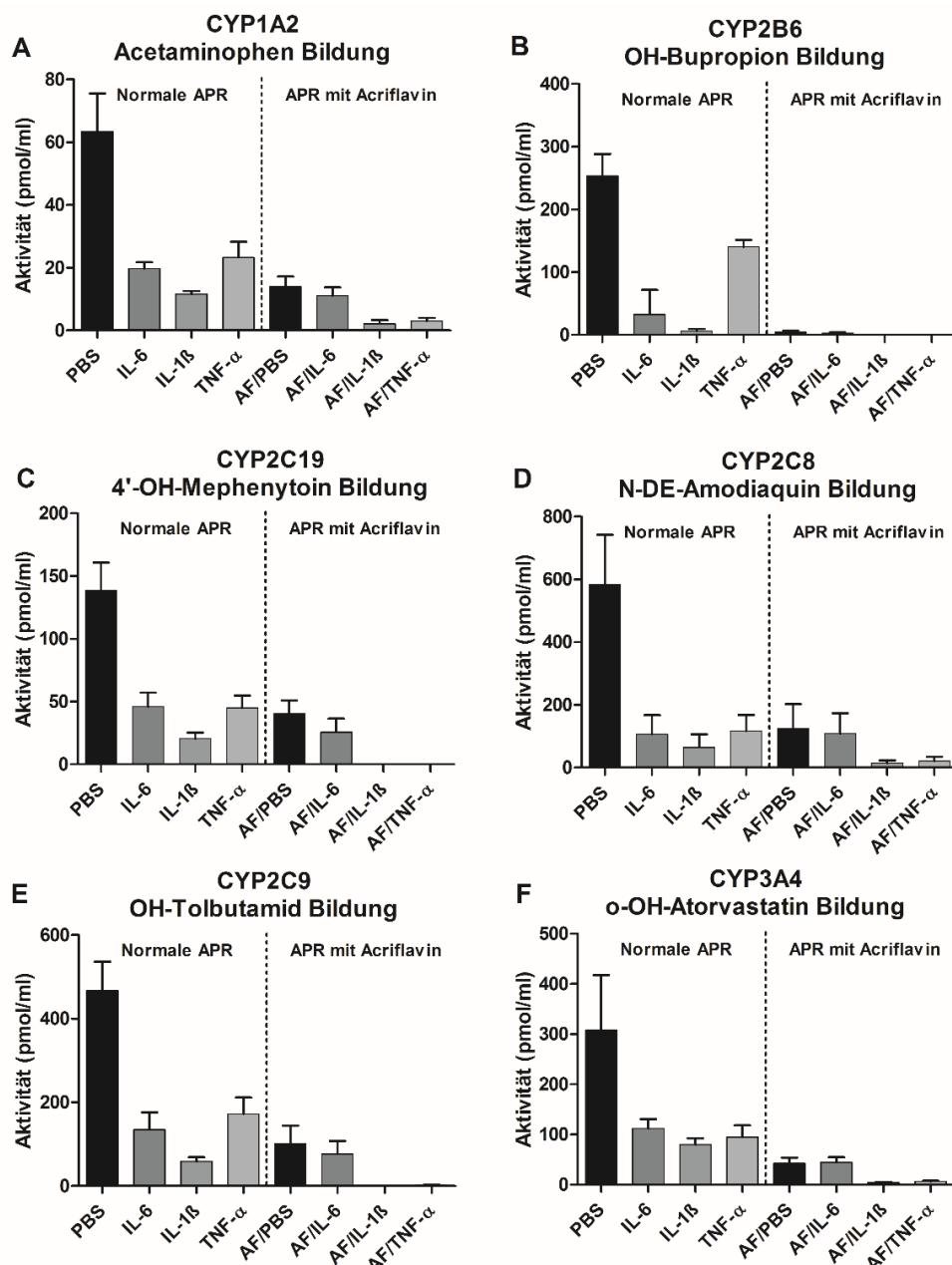
Da miRNAs hauptsächlich post-transkriptionell wirken, wurden die Effekte zuerst auf Enzymaktivitätsebene analysiert. Die APR mit und ohne AF wurde für 72 h durch Cytokine in HepaRG-Zellen induziert und dann ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (Abb. 37 und Abb. 38).

In Abb. 37 sind die absoluten Enzymaktivitäten dargestellt. Es war auffällig, dass alle AF/PBS-kontrollbehandelten Zellen eine um ca. 70 % erniedrigte Aktivität nach 72 h im Vergleich zu den PBS-behandelten Zellen aufwiesen. CYP2B6 war besonders stark betroffen. In den AF/cytokinbehandelten Zellen kam es jedoch nur für AF/IL-1 $\beta$  und AF/TNF- $\alpha$  zu einer weiteren Reduzierung der Aktivitäten, während für AF/IL-6 die Aktivitäten auf einer zur AF/PBS-Kontrolle vergleichbaren Höhe blieben.

Normalisierte man die Werte auf ihre jeweilige Kontrolle (PBS bzw. AF/PBS), entstand ein deutlicheres Bild (Abb. 38). Durch die Cytokinbehandlungen kam es zu der erwarteten Abnahme der Enzymaktivitäten. In den Kombibehandlungen führten

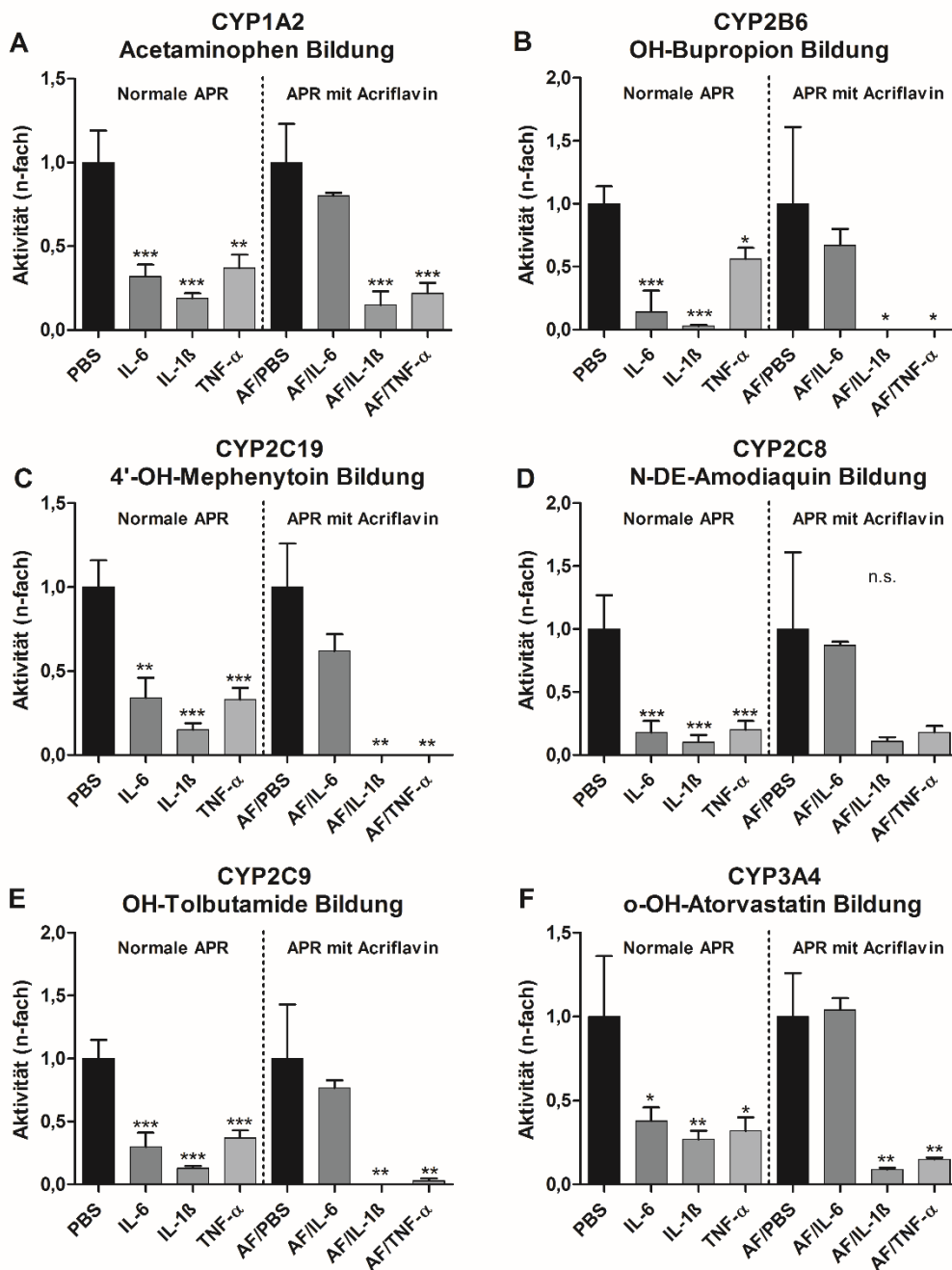
### 3. Ergebnisse

die AF/IL-1 $\beta$ - und AF/TNF- $\alpha$ -Behandlungen zu einer weiteren Abnahme der Aktivitäten im Vergleich zu den Einzelcytokinbehandlungen, während für AF/IL-6 kein signifikanter Unterschied zu seiner Kontrolle AF/PBS zu sehen war. AF scheint also spezifisch bei IL-6 eine Abnahme der Enzymaktivitäten durch das Cytokin zu verhindern.



**Abb. 37: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf CYP-Enzymaktivitäten (absolut).** In HepaRG-Zellen wurden Einzel- und Kombinationsbehandlungen durchgeführt (10 ng/ml IL-6 und TNF- $\alpha$ , 5 ng/ml IL-1 $\beta$  und dem Lösungsmittel als Kontrolle sowie 2  $\mu$ M Acriflavin) und nach 72 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (n= 3). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9) und F) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS gemessen.

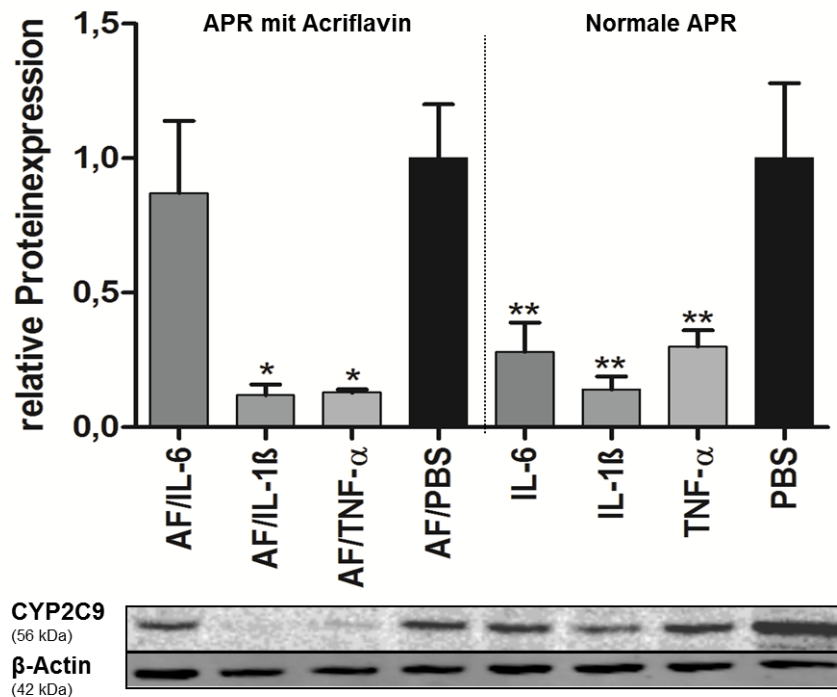
### 3. Ergebnisse



**Abb. 38: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf CYP-Enzymaktivitäten (relativ).** In HepaRG-Zellen wurden Einzel- und Kombinationsbehandlungen durchgeführt (10 ng/ml IL-6 und TNF- $\alpha$ , 5 ng/ml IL-1 $\beta$  und dem Lösungsmittel als Kontrolle sowie 2  $\mu$ M Acriflavin) und nach 72 h ein CYP-Cocktail-Assay durchgeführt (n= 3). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9) und F) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS. Die n-fachen Änderungen sind relativ zur Kontrolle (PBS bzw. AF/PBS) dargestellt. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung wurde durchgeführt: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001.

### 3.4.4.1.2 Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Acriflavin und Cytokinen auf die CYP2C9-Expression

Die APR mit und ohne AF wurde für 72 h durch Cytokine induziert und dann Protein isoliert. Die CYP2C9-Proteinexpression wurde exemplarisch mittels Western Blotting gemessen (Abb. 39).



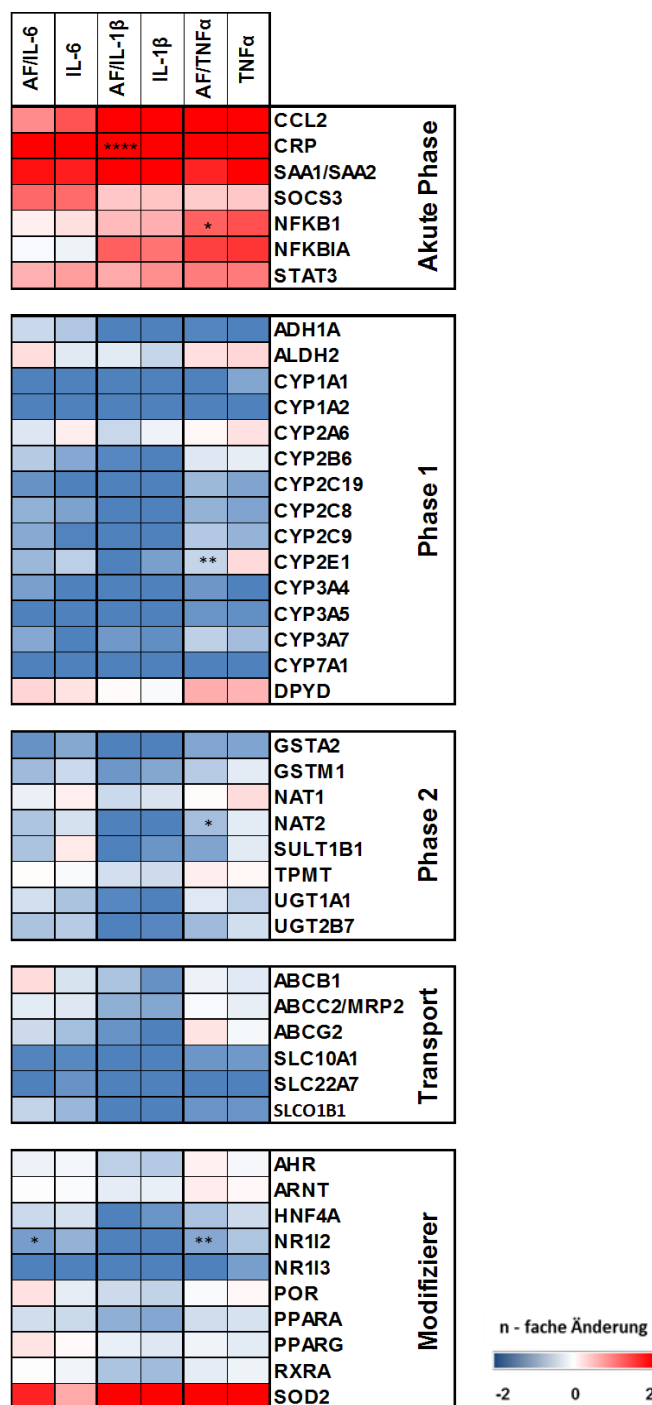
**Abb. 39: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf die CYP2C9 Proteinexpression.** In HepaRG-Zellen wurden Einzel- und Kombinationsbehandlungen (10 ng/ml IL-6, TNF- $\alpha$ , 5 ng/ml IL-1 $\beta$  und dem Lösungsmittel als Kontrolle sowie 2  $\mu$ M Acriflavin) durchgeführt und nach 72 h lysiert (n = 3). Die Messung der CYP2C9 Proteinexpression (56 kDa) erfolgte mittels Western Blotting (Normalisierung auf  $\beta$ -Actin (42 kDa) und Kontrolle (PBS bzw. AF/PBS)). Die n-fachen Änderungen sind relativ zur Kontrolle (PBS bzw. AF/PBS) dargestellt. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01.

Bei der normalen APR war es, wie erwartet, zu einer starken Herunterregulierung des CYP2C9-Proteins gekommen. Die Behandlung mit AF/PBS führte wie bei den Enzymaktivitäten zu differenzierten Änderungen: Während das CYP2C9-Protein unter AF-Einfluss für IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zur normalen APR stärker reduziert wurde, verhinderte die AF-Behandlung bei IL-6 die Abnahme von CYP2C9. Auch auf Proteinebene zeigte AF somit einen IL-6-spezifischen Effekt.

#### **3.4.4.1.3 Wirkung der Kombinationsbehandlung aus Acriflavin und Cytokinen auf die ADME-Genexpression**

Die APR mit und ohne AF wurde für 24 h durch Cytokine induziert und dann RNA isoliert. Die Expression von 47 ADME-Genen inklusive Akut-Phase-Genen wurde mittels qRT-PCR gemessen (Abb. 40). Auf Genexpressionsebene war eine ähnliche APR im Vergleich zu einer normalen APR unter AF sichtbar. Dabei kam es zu einer Herunterregulierung der meisten Phase I-, Phase II-Enzyme, Transporter und Regulatoren. Des Weiteren kam es zu einer Hochregulierung der Akut-Phase-Gene, wie z. B. *CCL2*. Nur für *CRP* (AF/IL-1 $\beta$ ) und *NFKBIA* (AF/TNF- $\alpha$ ) kam es zu einer höheren Zunahme als bei der normalen APR. Bei der Herunterregulierung der ADME-Gene unterschieden sich nur *CYP2E1*, *NAT2* und *NR1I2* (AF/TNF- $\alpha$ ) bzw. *NR1I2* (AF/IL-6) von der APR ohne AF.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 40: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf die ADME-Genexpression.** HepaRG-Zellen wurden mit Kombinationen aus Acriflavin (2 µM) und Cytokinen IL-6 (10 ng/ml), IL-1β (5 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) und dem Lösungsmittel als Kontrolle behandelt und nach 24 h lysiert (n = 3). Die Messung der ADME-Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Fluidigm, Normalisierung auf *GAPDH* und *AF/PBS* bzw. *PBS*). Die Heatmap zeigt die n-fachen Änderungen (log<sub>2</sub>) relativ zur *AF/PBS*- bzw. *PBS*-Kontrolle. Repeated Measures ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001 (Vergleich APR mit und ohne AF).



Da bereits einige Mechanismen bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung bekannt waren, war nicht davon auszugehen, dass miRNAs für die komplette Herunterregulierung verantwortlich sind, sondern nur einen Teil dazu beizutragen. Allerdings verhinderte die AF/IL-6-Behandlung überhaupt eine Abnahme der CYP3A4 Aktivität (siehe Abb. 38), was nicht allein durch miRNAs erklärt werden kann. Letztendlich konnte die Herkunft der entzündungsassoziierten miRNAs nicht endgültig geklärt werden.

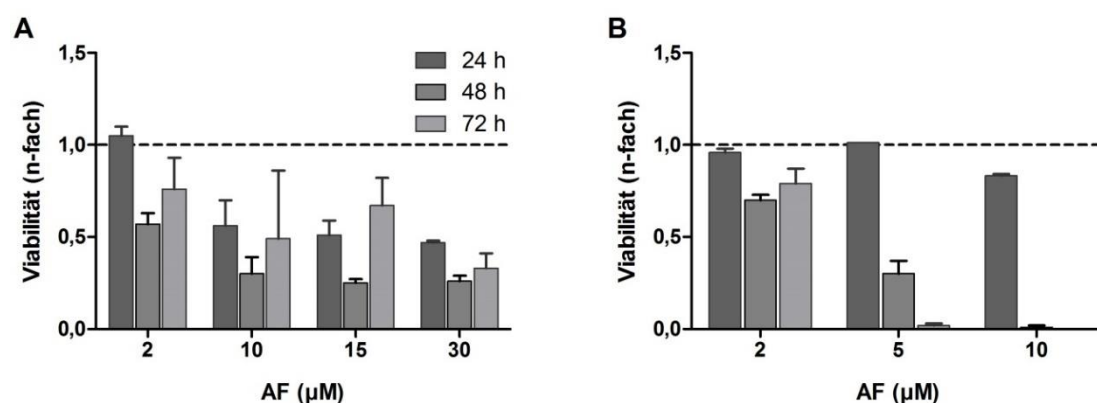
Der IL-6 spezifische Effekt von AF könnte durch eine Interferenz zwischen AF und dem IL-6-Signalweg über JNK/STAT erfolgt sein und dadurch eine Abnahme der ADME-Gene unter IL-6-Behandlung verhindern bzw. reduzieren. Eventuell könnte Acriflavin zusätzlich in weitere Signalwege eingreifen und so zu einer negativen Regulation der ADME in der Kontrollbehandlung geführt haben. Daher wurde die eigentliche Wirkung von Acriflavin auf ADME-Gene untersucht (siehe 3.4.4.2).

#### 3.4.4.2 Auswirkungen von Acriflavin auf ADME-Gene

In HepaRG-Zellen sollte der Einfluss von AF auf die Zellviabilität, ADME-Genexpression und CYP-Enzymaktivität getestet werden.

##### 3.4.4.2.1 Wirkung von Acriflavin auf die Zellviabilität

Um zu untersuchen, ob Acriflavin eventuell cytotoxisch wirkt, wurde die Zellviabilität mit zwei Viabilitätsassays, die auf unterschiedlichen Messprinzipien beruhen, in HepaRG-Zellen zeitabhängig getestet (Abb. 41 und Abb. 42).

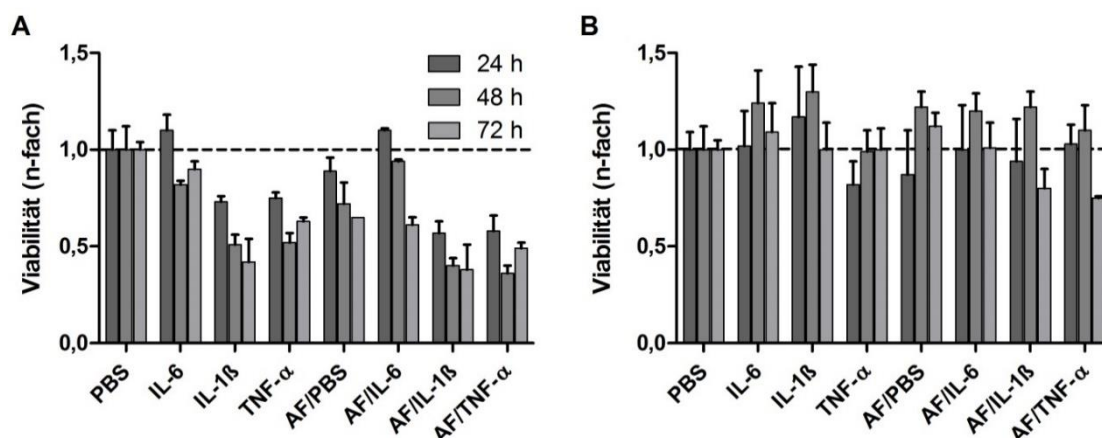


**Abb. 41: Einfluss von Acriflavin auf die Zellviabilität von HepaRG-Zellen.** Die Zellviabilität wurde mit dem A) LDH und B) Alamar-Blue-Assay nach 24, 48 und 72 h in Triplikaten gemessen. Die Zellen wurden mit 2-30 µM Acriflavin behandelt. Die n-fachen Änderungen sind relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt.

Mit dem LDH-Assay war eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität durch AF sichtbar (Abb. 41A). Bei 30 µM AF wiesen die Zellen bereits

### 3. Ergebnisse

nach 24 h nur eine Viabilität von ca. 20 % auf. Bei 2  $\mu$ M hingegen wiesen die Zellen nach 72 h noch eine Viabilität von ca. 70 % auf. Auch mit dem Alamar-Blue-Assay war eine konzentrations- und zeitabhängige Abnahme der Zellviabilität unter AF zu sehen (Abb. 41B). Die Ergebnisse für 2  $\mu$ M AF konnten mit beiden Assays reproduziert werden, während es für 10  $\mu$ M AF zu einer stärkeren Abnahme der Zellviabilität nach 72 h beim Alamar-Blue-Assay im Vergleich zum LDH-Assay kam



(Abnahme um ca. 95 % vs 55 %). Somit wirkte AF in Konzentrationen ab ca. 5  $\mu$ M cytotoxisch.

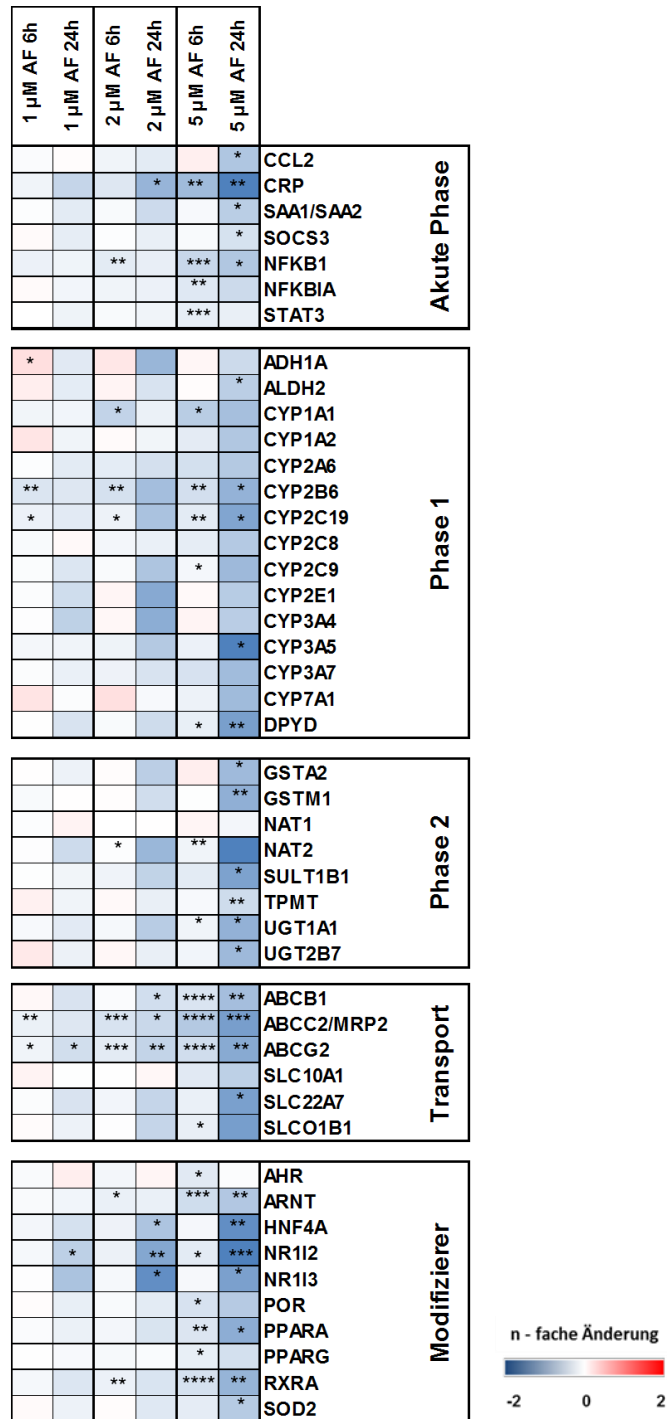
**Abb. 42: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf die Zellviabilität bei HepaRG-Zellen.** Die Zellviabilität wurde mit dem A) LDH und B) Alamar-Blue-Assay nach 24, 48 und 72 h in Triplikaten gemessen. Es wurden Einzel- und Kombinationsbehandlungen durchgeführt (10 ng/ml IL-6 und TNF- $\alpha$ , 5 ng/ml IL-1 $\beta$  und dem Lösungsmittel als Kontrolle sowie 2  $\mu$ M Acriflavin). Die n-fachen Änderungen sind relativ zu kontrollbehandelten Zellen dargestellt.

Die Zellviabilität wurde auch bei Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen in HepaRG-Zellen untersucht (Abb. 42). Hierbei wurden 2  $\mu$ M AF verwendet, da diese Konzentration von den Zellen toleriert wurde (Abb. 41). Der LDH-Assay zeigte sowohl bei den cytokin- als auch bei den kombibehandelten Zellen eine zeitabhängige Abnahme der Viabilität nach 72 h auf ca. 50 %. Der Alamar-Blue-Assay hingegen zeigte keine Abnahme der Viabilität bei cytokinbehandelten Zellen. AF/IL-1 $\beta$  und AF/TNF- $\alpha$ -behandelte Zellen wiesen nach 72 h eine Viabilität von ca. 75 % auf. Somit war eine cytotoxische Wirkung von 2  $\mu$ M AF in Kombination mit Cytokinen im Vergleich zu Einzel-Cytokinbehandlungen nicht gegeben.

#### **3.4.4.2.2 Wirkung von Acriflavin auf die ADME-Genexpression**

AF könnte sowohl direkte Effekte durch die Inhibition der Enzymaktivität als auch indirekte Effekte über Regulationsmechanismen, die letztendlich zu einer Herunterregulierung führen, auf ADME-Gene haben. Diese potentiellen Regulationsmechanismen wurden in HepaRG-Zellen durch die Behandlung mit unterschiedlichen AF Konzentrationen (1, 2, 5  $\mu\text{M}$ ) für 6 und 24 h untersucht. Die Expression von 47 ADME-Genen inklusive Akut-Phase-Gene wurde mittels qRT-PCR gemessen (Abb. 43). AF hatte für alle verwendeten Konzentrationen negative Auswirkungen auf *CYP2B6*, *CYP2C19*, *ABCC2*, *ABCG2* und *NR1I2*. Für *CRP*, *NFKB1*, *CYP1A1*, *ABCB1*, *ARNT*, *HNF-4 $\alpha$* , *NR1I3* und *RXRA* war für 2 und 5  $\mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige Regulation sichtbar. Vor allem nach 24 h waren die meisten ADME-Gene durch 5  $\mu\text{M}$  herunterreguliert. Eventuell zeigte sich hier durch 2  $\mu\text{M}$  AF eine beginnende indirekte Herunterregulierung der CYPs, vermittelt über Regulatoren wie HNF-4 $\alpha$ , NR1I2 und NR1I3.

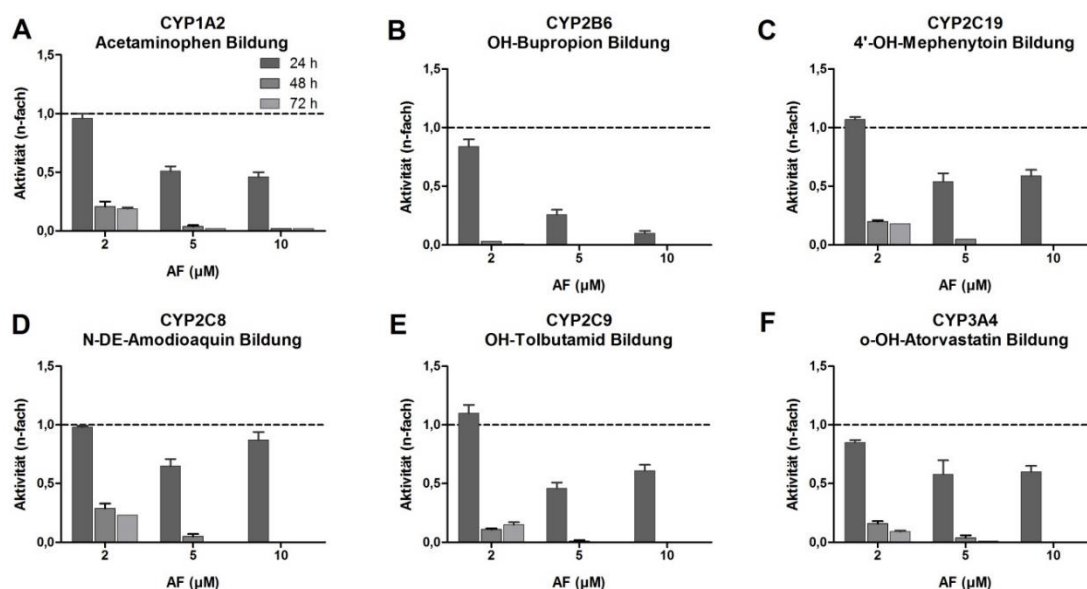
### 3. Ergebnisse



**Abb. 43: Einfluss von Acriflavin auf die ADME-Genexpression.** HepaRG-Zellen wurden mit 1, 2 und 5  $\mu$ M Acriflavin behandelt (Kontrolle: unbehandelt) und nach 6 und 24 h lysiert (n = 3). Die Messung der ADME-Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR (Fluidigm, Normalisierung auf *GAPDH* und unbehandelt). Die Heatmap zeigt die n-fachen Änderungen ( $\log_2$ ) relativ zur Kontrolle. Repeated Measure ANOVA mit Bonferroni-Adjustierung: \*, p < 0,05; \*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001; \*\*\*\*, p < 0,0001.

### 3.4.4.2.3 Wirkung von Acriflavin auf die CYP-Enzymaktivität

Zusätzlich zur ADME-Genexpression wurden indirekte Effekte von AF auf die CYP-Enzymaktivität untersucht. Um den Zeitverlauf der AF-abhängigen Regulation zu untersuchen, wurden HepaRG-Zellen für 24-72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen AF (2, 5 und 10  $\mu\text{M}$ ) behandelt und CYP-Aktivitäten gemessen (Abb. 44).



**Abb. 44: Indirekter Einfluss von Acriflavin auf CYP-Enzymaktivitäten - Zeitverlauf.** HepaRG-Zellen wurden mit 2-10  $\mu\text{M}$  Acriflavin für 24, 48 und 72 h behandelt (Kontrolle: unbehandelt). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9) und F) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS in Triplikaten gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt.

Nach 24 h kam es nur bei CYP2B6 und CYP3A4 zu geringen Abnahmen bei 2  $\mu\text{M}$  AF, während bei 5  $\mu\text{M}$  die Enzymaktivitäten bereits um 50 % reduziert waren (CYP2B6 sogar um ca. 70 %). Bei der Verwendung von cytotoxischen Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$  AF) waren die meisten CYP-Aktivitäten auf ca. 50 % reduziert, während CYP2B6 nur noch eine Restaktivität von 10 % hatte. Nach 48 h war nur noch ca. 20 % Restaktivität unter 2  $\mu\text{M}$  AF vorhanden, wobei CYP2B6 noch stärker betroffen war. Bei 5  $\mu\text{M}$  AF waren nur noch geringe Aktivitäten messbar. Bei 10  $\mu\text{M}$  war CYP1A2 minimal messbar, während wie anderen CYPs nicht messbar waren. Die Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  Acriflavin führt zu einer Reduzierung der CYP-Aktivitäten um ca. 80 % nach 72 h, für andere Konzentrationen waren CYP-Aktivitäten kaum messbar. Nach 48 h waren die CYP-Aktivitäten bereits bei 2  $\mu\text{M}$  AF auf 20 % reduziert. Dies spricht für einen regulatorischen Mechanismus durch AF, da nach 24 h bei 2  $\mu\text{M}$  noch keine große Abnahme der Aktivitäten sichtbar war.

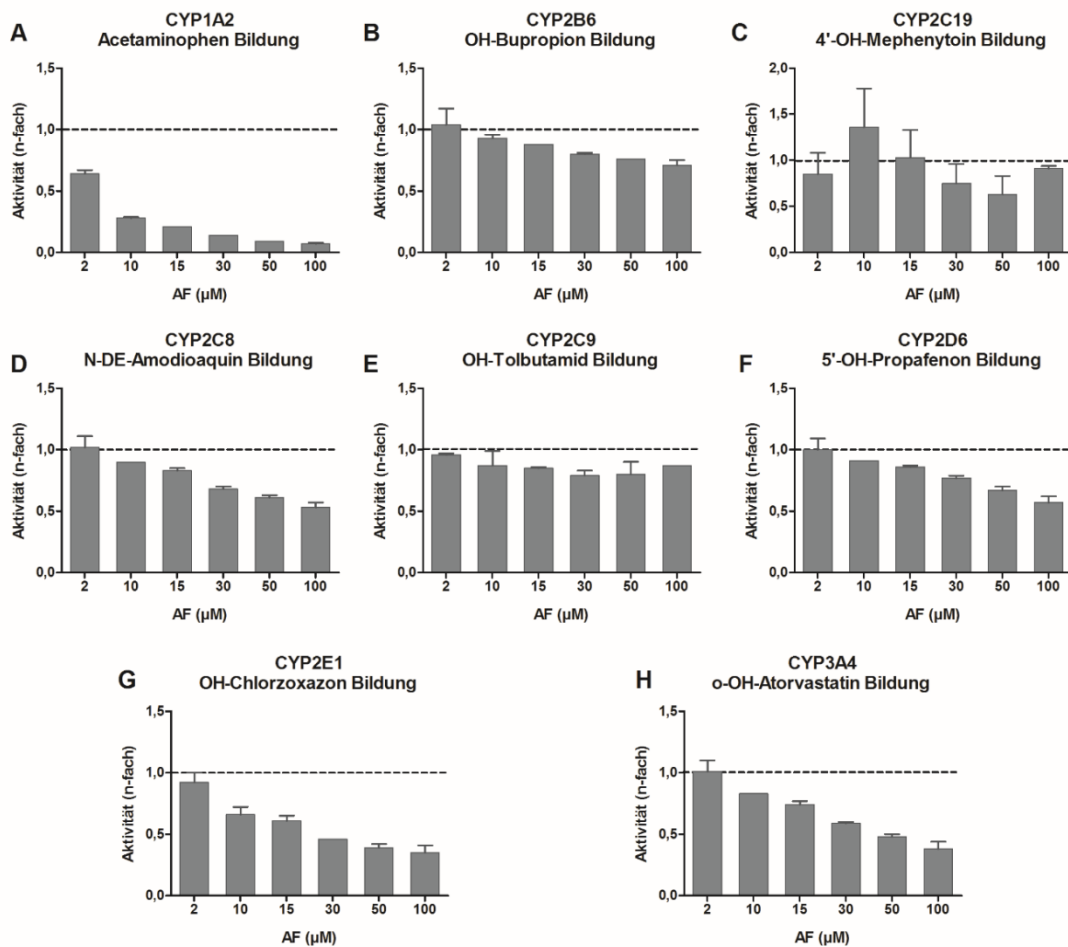
### 3. Ergebnisse

---

Um die direkten Effekte von AF auf CYP-Enzymaktivitäten zu untersuchen, wurden Inkubationen von humanen Lebermikrosomen mit unterschiedlichen AF Konzentrationen (2, 10, 15, 30, 50 100  $\mu\text{M}$ ) und dem CYP-Substrat-Cocktail-Mix durchgeführt (Abb. 45). Da CYPs in Lebermikrosomen als geschlossenes System vorliegen, können hier im Vergleich zum Zellmodell keine Regulationsmechanismen zum Tragen kommen. Für fast alle CYPs war eine konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivitäten sichtbar, außer für CYP2C19 und CYP2C9. Dabei war CYP1A2 am stärksten betroffen (Abnahme um 40 % bereits bei 2  $\mu\text{M}$ ), während die meisten CYPs noch 60-80 % Aktivität bei 100  $\mu\text{M}$  aufwiesen. Nur CYP2E1 und CYP3A4 wiesen bei 100  $\mu\text{M}$  noch eine Restaktivität von ca. 40 % auf (CYP1A2 ca. 10%). Eine direkte Inhibierung durch AF bei niedrigen Konzentrationen (<10  $\mu\text{M}$ ) ergab sich nur für CYP1A2. Die Inhibierung der CYP-Aktivität durch AF scheint nur zu einem geringen Maß für hohe AF Konzentrationen der Fall zu sein.

Es ist davon auszugehen, dass AF über indirekte Regulationsmechanismen wie z. B. NR und TF zu einer Abnahme der CYPs führte. Welche Signalwege dabei involviert sind, ist nicht abschließend geklärt.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 45: Direkter Einfluss von Acriflavin auf CYP-Enzymaktivitäten.** Gepoolte Lebermikrosomen wurden mit dem CYP-Substrat-Cocktail-Mix für 20 min inkubiert (n = 2). Die Bildung der Metabolite A) Acetaminophen (CYP1A2), B) OH-Bupropion (CYP2B6), C) 4'-OH-Mephenytoin (CYP2C19), D) N-DE-Amodiaquin (CYP2C8), E) OH-Tolbutamid (CYP2C9), F) 5'-OH-Propafenon (CYP2D6), G) OH-Chlorzoxazon (CYP2E1) und H) o-OH-Atorvastatin (CYP3A4) wurde mittels LC-MS/MS in Duplikaten gemessen. Die n-fachen Änderungen sind relativ zu unbehandelten Lebermikrosomen dargestellt.





### 4. Diskussion

Entzündliche Bedingungen führen durch die Herunterregulierung der ADME-Gene in der Leber zu einer starken Einschränkung des Arzneistoffmetabolismus. Die Beteiligung verschiedener Mechanismen war bereits seit einiger Zeit diskutiert worden. Im ersten Teil der Arbeit wurde die Verwendbarkeit von KHH als hepatisches Modell für den Arzneistoffmetabolismus im Vergleich zu anderen Modellen untersucht. Allerdings zeigten KHH nicht die gewünschten Eigenschaften zur Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus, wohingegen HepaRG-Zellen ein robustes Modell darstellten.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Rolle von NR bei der Herunterregulierung von ADME-Genen analysiert. Unter Cytokineinfluss zeigte RXR $\alpha$  auf Proteinebene nur eine teilweise Abnahme, während es bei PXR zu einer stärkeren Abnahme kam.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von entzündungsassoziierten miRNAs als neuartige Regulationsschiene bei der Herunterregulierung von ADME-Genen untersucht. Durch entzündungsassoziierte miRNAs konnte eine negative Regulation von ADME-Genen sowohl auf mRNA- als auf Enzymaktivitätsebene gezeigt werden. Auch in Kombination hatten miRNAs eine zum Teil verstärkte Wirkung auf ADME-Gene. Des Weiteren wurden funktionale Bindestellen dieser miRNAs mittels Luciferase-Reporter-Assays validiert. Außerdem wurde untersucht, ob diese miRNAs in Hepatozyten hochreguliert werden. Eine Induktion von miRNAs durch Cytokine konnte nachgewiesen werden. Wurde der Einfluss von endogenen miRNAs durch AF unterbunden, kam es bei IL-6-Behandlung nicht zu der erwarteten Abnahme der CYPs, was auf eine Rolle der miRNAs hinweisen könnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass entzündungsassoziierte miRNAs in der Lage sind, ADME-Gene negativ zu regulieren.

#### 4.1 Evaluation hepatischer Zellmodelle für den Arzneistoffmetabolismus

Da vor allem Mausmodelle Unterschiede im Vergleich zum Menschen bezüglich ihres Verhaltens bei entzündlichen Bedingungen aufweisen, ist die Auswahl eines geeigneten humanen hepatischen Zellmodells von Bedeutung (Seok et al. 2013).

Mittlerweile sind verschiedene humane hepatische Zellmodelle wie PHH, KHH und HepaRG-Zellen für die Arzneimittelforschung verfügbar. Diese unterscheiden sich in einigen Eigenschaften wie Kulturdauer, Stabilität und Verfügbarkeit etc. KHH von gepoolten Leberdonoren sollten im Vergleich zu den anderen Modellen getestet

werden, da dieses Format noch nicht lange verfügbar gewesen war und einige Vorteile bietet. Außerdem war es wichtig, die verschiedenen Zellmodelle zu testen, um festzustellen, welches der Zellmodelle am geeignetsten für die zu untersuchenden Hypothesen war. PHH sind nach wie vor der Goldstandard bei Untersuchungen des Arzneistoffmetabolismus in der Leber (LeCluyse und Alexandre 2010). Die hier getesteten PHH wiesen im Vergleich zu KHH und HepaRG-Zellen die höchsten CYP-Enzymaktivitäten auf (Abb. 10). Die CYP-Enzymaktivitäten von KHH schienen durch die Kryokonservierung im Vergleich zu frischen PHH stark abgenommen zu haben. Dies war auch in anderen Vergleichsarbeiten der Fall, unter anderem auch für Transporter (Roymans et al. 2004; Badolo et al. 2011). Im Jahr 1999 wurde die Verwendung von KHH für CYP-Induktionsstudien von einem internationalen Gremium nicht empfohlen, da gerade CYP1A2 und CYP3A4 in ihrer Aktivität um 50 % pro Tag abnehmen können (Li et al. 1999). In der Tat sahen Roymans et al. (2004) eine erniedrigte Aktivität von CYP1A2 in KHH (drei verschiedene Donoren), während die CYP3A4 Aktivität aber mit PHH vergleichbar war. Die hier untersuchten CYP2C9 und CYP2B6 Aktivitäten hatten eine ähnliche Höhe in PHH und HepaRG-Zellen, was die Ergebnisse von Turpeinen et al. (2009) bestätigt (Abb. 10). HepaRG-Zellen bieten somit eine gute Alternative PHH zu ersetzen (Turpeinen et al. 2009; Williamson et al. 2016; Yokoyama et al. 2018).

Durch Dedifferenzierung kommt es in der Regel bei PHH zu einer zeitabhängigen Abnahme von CYP-Aktivitäten (Godoy et al. 2013). Bei den untersuchten KHH und PHH war eine zeitabhängige Abnahme der CYP-Aktivitäten zu sehen. Allerdings nahmen bei KHH die CYP-Aktivitäten noch schneller ab als bei PHH, bei denen es vor allem vom Isoenzym abhängig war (Abb. 11). HepaRG-Zellen zeigten in den Vergleichsexperimenten über fünf Tage stabile CYP-Aktivitäten, die auch bei weiterer Kultivierung bis zu vier Wochen stabil blieben. Daher sind diese im Vergleich zu KHH und PHH vor allem für die Langzeitkultivierung geeignet (Turpeinen et al. 2009; Tolosa et al. 2016). Jedoch benötigen HepaRG-Zellen eine sehr lange Vorlaufzeit (bis zu 6 Wochen inklusive Differenzierung), bis sie in Experimenten eingesetzt werden können (Jackson et al. 2016). Ein Nachteil von HepaRG-Zellen sind außerdem die niedrigen Aktivitäten von CYP2E1 und CYP2D6 (Aninat et al. 2006; Guillouzo et al. 2007; Turpeinen et al. 2009).

Da die Rolle von miRNAs bei der APR untersucht werden sollte, war es wichtig, dass Cytokine eine APR in den Zellmodellen induzieren können (Abb. 12). Evers et al. (2013) empfahlen unter anderem die Suppression von CYP3A4 durch IL-6-Behandlung

zu messen, um das Ansprechen eines Zellmodells auf Cytokine zu testen. Klein et al. (2015) konnte für HepaRG-Zellen zeigen, dass diese eine ähnliche APR aufweisen wie PHH. Diese Ergebnisse konnten reproduziert werden (Abb. 12 und Abb. 14A). KHH wiesen dagegen durch IL-6 kaum eine Inhibierung der CYP-Aktivitäten auf und auch auf mRNA-Ebene war nur für CYP3A4 eine Reduzierung sichtbar.

In den hier getesteten KHH war zudem nur eine 2-fache Induktion der CYP3A4 Aktivität durch Rifampicin zu sehen, während in anderen Arbeiten eine 4- bzw. 8-fache Induktion der CYP3A4 Aktivität gemessen wurde (Abb. 13) (Roymans et al. 2004; Halladay et al. 2012; Liu et al. 2016). Bei den untersuchten HepaRG-Zellen kam es zu einer 15-fachen Induktion der *CYP3A4* mRNA, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Gerets et al. (2012) ist. In der Arbeit von Gerets et al. (2012) waren HepaRG-Zellen im Vergleich zu PHH und HepG2-Zellen das am besten induzierbare Modell.

Alle Zellmodelle zeigten eine gute Transfektionseffizienz mit siRNAs, während größere Moleküle wie Plasmide kaum in die Zellen eingebracht werden konnten (Abb. 15-17) (Ourlin et al. 1997; Laurent et al. 2010). Für solche Untersuchungen gibt es die Möglichkeit der Elektroporation, damit die Zellen die Plasmid-DNA besser aufnehmen (Laurent et al. 2010; Demazeau et al. 2017). Danach müssen differenzierte Zellen aber wieder mit einer sehr hohen Zelldichte ausgesät werden. Sonst kommt es zu einer geringen Anheftung der Zellen (Laurent et al. 2010). PHH können auch lentiviral mit Plasmiden transfiziert werden, was aber ein sehr aufwendiges Verfahren darstellt (Thomas et al. 2014). Gerade bei neuartigen Anwendungen wie z. B. CRISPR/Cas9 sollten diese Eigenschaften getestet werden, um zu überprüfen, ob Cas9-kodierende Plasmide in die Zellen gelangen (Kennedy et al. 2015).

Nachteile von PHH sind die seltene Verfügbarkeit, die aufwendige Isolierung und die sofortige Aussaat wenige Stunden nach der Isolation (Godoy et al. 2013). Des Weiteren hängen die Eigenschaften der PHH auch von der genetischen Ausstattung der Donoren ab und zeigen somit eine hohe Variabilität (Rogue et al. 2012). Bei der Metabolisierung von CYP2D6-Substraten sind z. B. langsame und schnelle Metabolisierer, die abhängig vom Genotyp sind, bekannt (Zanger 2014).

Der Zweck der Verwendung von gepoolten KHH (aus 10 Donoren) war, die hohe Variabilität zwischen verschiedenen Donoren zu reduzieren und eine bessere Planung der Experimente und Reproduzierbarkeit im Vergleich zu PHH zu erreichen (Roymans et al. 2004; Li 2015; Yokoyama et al. 2018). Trotzdem war keine ausreichende

Reproduzierbarkeit der Experimente sichtbar gewesen. Möglicherweise könnten Zellen aus zehn verschiedenen Donoren zu unterschiedlichem Anheftungsverhalten der Zellen führen und einen ungleichmäßigen Zellrasen bilden (Abb. 9B). Bei der Generierung von gepoolten KHH werden die bereits kryokonservierten Zellen aufgetaut, gepoolt und wieder kryokonserviert, was die Zellen stressen könnte (Li 2015). Viele Arbeiten mit KHH zeigten zudem eine Abhängigkeit der verwendeten Charge. Eventuell müssten mehrere Donoren getestet werden, um eine geeignete Charge zu finden. Ähnlich wie bei PHH gibt es geeignete Donoren und weniger geeignete Donoren (Roymans et al. 2004; Yokoyama et al. 2018). Die Testung der Charge KCB zeigte keine typische Hepatozytenmorphologie und nur geringe CYP-Aktivitäten im Vergleich zu PHH und war somit für die hier untersuchten Fragestellungen nicht geeignet (Abb. 9B und Abb. 10). Eventuell könnte man weitere Donoren bzw. Chargen testen. Allerdings kann die Suche nach geeigneten Donoren sehr zeit- und kostenaufwendig sein (Yokoyama et al. 2018).

Aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit, der hohen Kosten und der Variabilität von PHH wird vermehrt an der Entwicklung und Verwendung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) geforscht. Dabei werden pluripotente Stammzellen durch verschiedene Faktoren angeregt, sich in Hepatozyten umzuwandeln bzw. zu differenzieren. Allerdings ist dies ein langwieriger Prozess (ca. 26 Tage) und die generierten Hepatozyten weisen einige Unterschiede zu PHH auf wie z. B. eine unvollständige Polarisierung und fehlende Expression von Transportern (Gieseck et al. 2015). Daher ist weitere Forschung nötig, um PHH vollständig durch iPSC ersetzen zu können.

Bei den zur Verfügung stehenden 2D-Zellmodellen erwiesen sich KHH aufgrund der getesteten Eigenschaften für weitere Untersuchungen als nicht geeignet. Daraufhin wurden HepaRG-Zellen für die Untersuchung von miRNA-Effekten angesichts ihrer guten Verfügbarkeit, Stabilität und Induzierbarkeit der APR verwendet. Letztendlich hängt die Wahl des Zellmodells von den jeweiligen Fragestellungen und geplanten Experimenten ab und sollte im Vorhinein gut durchdacht sein bzw. getestet werden.

Eine noch geeignetere Abbildung der *in vivo* Verhältnisse im Vergleich zu Hepatozytenkulturen ist eine Ko-Kultur mit anderen Zelltypen wie z. B. Kupffer-Zellen (Nguyen et al. 2015). Studien mit 2D-Hepatozytenmonokulturen sind insoweit reglementiert, dass sie nicht die komplexen Zusammenhänge zwischen den beteiligten Cytokinen und Zelltypen widerspiegeln, die bei entzündlichen Bedingungen eine Rolle spielen. Hinzu kommt die hohe Variabilität zwischen den Donoren, die allgemeine

Aussagen erschwert (Evers et al. 2013; Kenny et al. 2013; Nguyen et al. 2015). Nguyen et al. (2015) konnte zeigen, dass eine Ko-Kultur aus Hepatozyten und aus der Leber isolierte Kupffer-Zellen vergleichbare Effekte durch IL-6-Behandlung im Vergleich zu Hepatozytenmonokulturen zeigten. Unter IL-1 $\beta$ -Einfluss zeigte das Ko-Kulturmodell aber eine größere Freisetzung von Cytokinen, eine höhere Expression von APPs und eine stärkere Herunterregulierung von ADME-Genen und eine längere Stabilität in der Kultur (über zwei Wochen). Allerdings gibt es noch nicht viel Erfahrung mit Ko-Kultursystemen und die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit solcher Daten sind schwierig (Nguyen et al. 2015).

Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von 3D-Kulturmodellen wie Spheroide oder Organoide, die eine Annäherung an die in der Leber vorherrschende Struktur erlauben. HepG2-Zellen, die in der Regel nur eine sehr geringe Expression und Aktivität von ADME-Genen aufweisen, zeigten durch verschiedene 3D-Kultivierungsmethoden eine höhere metabolische Kompetenz (Luckert et al. 2017). Auch die 3D-Kultivierung von KHH als Spheroide führte für die meisten CYPs zu einer Erhöhung der Expression und Aktivität sowie einer höheren Induzierbarkeit im Vergleich zu 2D-kultivierten KHH (Berger et al. 2016). Bei der 3D-Kultivierung ist zudem durch den Erhalt der hepatischen Funktionen eine längere Kultivierung von PHH im Vergleich zu 2D-Kulturen möglich (Ohkura et al. 2014). Krankheitszustände der Leber wie Cholestase, Steatose und virale Hepatitis konnten durch die 3D-Kultivierung von PHH induziert und untersucht werden (Bell et al. 2016). Die Generierung von Organoiden aus Hepatozyten eignet sich beispielsweise als Leberkrebsmodell oder für die Arzneistoffentwicklung (Broutier et al. 2017). Ein mittlerweile aufkommendes Gebiet beschäftigt sich mit der Etablierung von Plattformen, die auf Chipbasis mithilfe verschiedener Zelltypen eine Leber durch Perfusion simulieren (*liver-on-a-chip*) (Lauschke et al. 2019). Eventuell könnten diese Plattformen zukünftig Toxizitätsstudien in Tieren ersetzen (Marx et al. 2012; Maschmeyer et al. 2015).

### **4.2 Rolle von nukleären Rezeptoren bei der Herunterregulierung von ADME-Genen**

Der Beitrag transkriptioneller Mechanismen zur Herunterregulierung von ADME-Genen bei entzündlichen Bedingungen wurde schon seit einiger Zeit diskutiert. NR, die hauptsächlich eine Rolle in der induzierbaren Regulation von CYPs spielen, sind bereits als wichtige Faktoren in der Herunterregulierung von ADME-Genen bekannt (Beigneux et al. 2002; Renton 2005). Keller et al. (2016) konnten in einem

systembiologischen Ansatz in PHH zeigen, dass NR insbesondere mit ihrem heterodimeren Bindungspartner RXR $\alpha$  als Duplex eine wichtige Rolle bei der Herunterregulierung der ADME-Gene spielen. Dennoch war noch nicht genau untersucht worden, wie RXR $\alpha$  und PXR sich auf Proteinebene unter Cytokineinfluss verhielten.

### 4.2.1 Rolle von RXR $\alpha$

Um die Rolle von RXR $\alpha$  zu untersuchen, wurden HepaRG-Zellen mit verschiedenen Cytokinen einzeln und in Kombinationen behandelt. Während Cytokine eine kombinatorische Wirkung auf die CYP-Aktivitäten zeigten, war dies bei RXR $\alpha$  nicht der Fall (Abb. 18-20). Allerdings führten die Cytokinkombinationsbehandlungen im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zu länger anhaltenden Effekten auf das RXR $\alpha$ -Protein (Abb. 19 und Abb. 20). In Rattenhepatozyten konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus IL-6 und IL-1 $\beta$  zu additiven Effekten auf die CYP2C11 mRNA, einem Ortholog des humanen CYP2C9, führte (Chen et al. 1995). Dickmann et al. (2012) hingegen sahen für diese Kombination in PHH nur in bestimmten Fällen additive Effekte auf CYP mRNAs. Somit können Cytokine in bestimmten Fällen kombinatorisch wirken.

Da Einzelbehandlungen mit Cytokinen zu einer teilweisen Herunterregulierung von RXR $\alpha$  auf Proteinebene führten, aber keine signifikanten Auswirkungen auf die Genexpression zu sehen waren (Abb. 19), war die Vermutung, dass miRNAs an der Proteinabnahme von RXR $\alpha$  beteiligt sein könnten. MiRNAs könnten dabei als posttranskriptionelle Regulatoren die Translation der mRNA in das Protein inhibieren und somit nur zu Effekten auf Proteinebene führen. Für RXR $\alpha$  konnte eine vorhergesagte Bindestelle für die entzündungsassoziierten miR-130b-3p mithilfe von Luciferase-Reporter-Assays als funktionell validiert werden (Abb. 25F). Während einer entzündlich bedingten APR könnte es zu einer negativen Regulation des RXR $\alpha$ -Proteins durch die hochregulierte miR-130b in der Leber kommen. Rieger et al. (2015) sahen keine Herunterregulierung der RXR $\alpha$ -mRNA durch die Überexpression von miR-130b. Daher ist davon auszugehen, dass miR-130b zu einer Repression der Translation von RXR $\alpha$  führt. Somit können miRNAs ADME-Gene auch indirekt über RXR $\alpha$  regulieren.

Die partielle Abnahme des RXR $\alpha$ -Proteins kann aber nicht allein die dramatische Herunterregulierung verschiedenster ADME-Gene erklären. Zimmerman et al. (2006) nahmen einen nukleären Export von RXR $\alpha$  unter dem Einfluss von IL-1 $\beta$  an. Dies führt letztendlich zu einem Funktionsverlust von RXR $\alpha$ , da es normalerweise im Nukleus

aktiv ist. Andere Arbeiten nahmen an, dass RXR $\alpha$  durch Cytokine post-translational modifiziert wird und somit seine Funktion verliert (Lee et al. 2000). Daher wurden HepaRG-Proteinlysate mit PNGase F behandelt, um zu überprüfen, ob es sich eventuell um eine Glykosylierung des RXR $\alpha$ -Proteins handelte (Abb. 21). Durch die Enzymbehandlung kam es aber bei allen Cytokinbehandlungen zu keiner Verschiebung des Molekulargewichts von RXR $\alpha$ , was somit eine post-translational Modifikation durch Glykosylierung ausschließt. Weitere post-translational Modifikationen wie SUMOylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung könnten in Frage kommen. Solomon et al. (1999) identifizierten bei RXR $\alpha$  am Serin 260 eine Phosphorylierungsstelle für MAPK, welche zum Verlust der Transaktivität von RXR $\alpha$  führte. Auch Lee et al. (2000) konnten eine Phosphorylierung von RXR $\alpha$  durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase 4 (MKK4/SEK1), welche im MAPK-Weg involviert ist, nachweisen. Unter IL-1 $\beta$ -Behandlung konnte auch eine Phosphorylierung von RXR $\alpha$  durch die c-Jun N-terminale Kinase in HepG2-Zellen nachgewiesen werden (Li et al. 2002). Daher wurden 2D-Western Blots mit cytokinbehandelten HepaRG-Zellen durchgeführt, um weitere Proteinveränderungen zu überprüfen (Abb. 22). Je nach Cytokinbehandlung kam es zu unterschiedlichem Verhalten des RXR $\alpha$ -Proteins. Auffällig waren hier vor allem die IL-6-Behandlungen, da eine RXR $\alpha$ -Isoform im Vergleich zu den anderen Cytokinbehandlungen bei einem sehr niedrigen pH-Wert auftrat. Durch weitere Untersuchungen müsste geklärt werden, um welche post-translational Modifikation es sich hier handeln könnte. Hierfür würden sich chromatographische und massenspektrometrische Methoden eignen (Macek et al. 2009; Mann et al. 2002).

Letztendlich konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es zu einem Funktionsverlust von RXR $\alpha$  durch post-translational Modifikationen unter Cytokineinfluss kommt. Da miR-130b in Lebern von Patienten mit erhöhtem Entzündungsmarker CRP hochexprimiert vorlag, könnte diese zur Regulation von RXR $\alpha$  bei Entzündung beitragen und damit indirekte Effekte auf ADME-Gene haben. Zusammenfassend scheint RXR $\alpha$  eine Rolle bei der Herunterregulierung der induzierbaren CYPs zu spielen. Jedoch scheint dieser Beitrag durch weitere Faktoren wie miRNAs und Kinasen beeinflusst zu sein, was auf ein großes Regulationsnetzwerk schließen lässt. Insgesamt kann der Beitrag von RXR $\alpha$  nicht allein die starke Herunterregulierung der ADME-Gene erklären. Daher könnten NR als Bindungspartner von RXR $\alpha$  eine größere Rolle spielen.

### 4.2.2 Rolle von nukleären Rezeptoren

PXR ist neben CAR einer der zentralen NR, die an der Regulation des Arzneistoffmetabolismus beteiligt sind. Eine starke Herunterregulierung von PXR durch Cytokine nach 24 h war bereits auf mRNA-Ebene bekannt gewesen (Klein et al. 2015). Außerdem kam es durch IL-6 zu einer Abnahme des PXR-Proteins um 40 % nach 24 h in HepG2-Zellen (Ning et al. 2017). Dennoch war aufgrund des Fehlens guter Antikörper gegen PXR wenig über das Proteinverhalten bekannt. Ein neuer PXR-Antikörper wurde mithilfe eines *in vitro* translatierten PXR-Proteins validiert (Abb. 23). In HepaRG-Zellen kam es unter Cytokineinfluss nach 48 h zu einer starken Abnahme des PXR-Proteins im Vergleich zu RXR $\alpha$ , welche auch nach 96 h anhielt (Abb. 24). Dies bestätigte die Ergebnisse von Yang et al. (2010), die ebenso bei IL-6-Behandlung eine Abnahme des PXR-Proteins um 60 % in PHH sahen. IL-1 $\beta$  zeigte sowohl bei PXR als auch bei RXR $\alpha$  die stärksten Effekte. PXR scheint somit auf Proteinebene einen größeren Beitrag an der Herunterregulierung zu haben als RXR $\alpha$ . Allerdings sollte der Beitrag des Funktionsverlustes von RXR $\alpha$  z. B. durch den Export aus dem Nukleus nicht unterschätzt werden (Zimmerman et al., 2016).

Nicht nur die Herunterregulierung von PXR und CAR auf mRNA-Ebene trägt zum Verlust der CYPs bei, sondern auch die Transaktivität der NR ist unter Cytokineinfluss eingeschränkt (Tanner et al. 2018). Dies könnte ein Hinweis auf post-translationale Modifikation der NR durch Cytokine sein. Außerdem wird die Regulation von PXR durch NF- $\kappa$ B diskutiert (Gu et al. 2006). Gu et al. (2006) konnten zeigen, dass NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  aktiviert wird und direkt mit RXR $\alpha$  interagiert. Die Folge ist, dass die Transaktivität von PXR eingeschränkt ist. Abualsunun und Piquette-Miller (2017) gingen ebenso davon aus, dass PXR-regulierte Transporter unter LPS-Behandlung hauptsächlich durch NF- $\kappa$ B in Mäusen herunterreguliert wurden, unabhängig von PXR. Allerdings könnte in diesem Fall die Herunterregulierung über andere NR stattfinden (Gu et al. 2006; Shah et al. 2014). Ferner führten entzündungsaktivierte Kinasen wie PKA und PKC zur Unterdrückung der Transaktivität von PXR, wahrscheinlich durch Stärkung der Interaktion zwischen PXR und dem Korepressor NCoR (Ding und Staudinger 2005; Lichti-Kaiser et al. 2009). Weitere Mechanismen könnten Protein-Protein-Interaktionen und die Phosphorylierung von PXR und seinen Koregulatoren sein (Pondugula et al. 2009).

Dennoch zeigten Mäuse trotz KO von PXR bzw. PPAR $\alpha$  Endotoxineffekte auf CYPs. Eventuell kompensieren andere NR den KO von PXR (Richardson und Morgan 2005). Ausgeschlossen werden kann natürlich nicht, dass NR wie HNF-4 $\alpha$ , CAR und PPAR $\alpha$



durch Cytokine bzw. Entzündung negativ betroffen sind und sich auf die Expression der CYPs auswirken.

Infolge von Cytokinbehandlungen kommt es bei PXR sowohl zu einer starken mRNA- als auch Proteinabnahme. Des Weiteren scheint seine Transaktivität eingeschränkt zu sein und eventuell im Zusammenspiel mit seinem Bindungspartner RXR $\alpha$  einen Einfluss auf die Herunterregulierung der induzierbaren CYPs zu haben. Je nach Modell könnten diese Einflüsse aber wahrscheinlich durch andere NR oder Cytokine kompensiert werden und auch unabhängig von PXR zu einer Herunterregulierung der CYPs führen. Da die CYP-Familien aber unterschiedlich reguliert werden, können NR nicht als alleiniger Mechanismus an der Herunterregulierung beteiligt sein.

### **4.3 Einfluss von entzündungsassoziierten microRNAs auf die ADME Expression**

Da es durch entzündliche Mediatoren wie Cytokine zur Abnahme von CYP-Transkripten kommt, wird die transkriptionelle Regulation als Hauptmechanismus bei der Herunterregulierung von ADME-Genen diskutiert (Klein et al. 2015). MiRNAs spielen als Regulatoren in verschiedensten Prozessen eine Rolle (Kloosterman und Plasterk 2006). Obwohl die Regulation von ADME-Genen durch miRNAs schon längere Zeit bekannt war, wurde die Rolle von miRNAs bei der Herunterregulierung von ADME-Genen bei Entzündung bisher allerdings noch nicht genau untersucht (Takagi et al. 2008; Mohri et al. 2010; Kida et al. 2011; Rieger et al. 2013; Rieger et al. 2015). Aus diesem Grund wurden weitere entzündungsassoziierte miRNA-Kandidaten aus der Masterarbeit in HepaRG-Zellen auf ihre Effekte auf ADME-Gene getestet.

#### **4.3.1 Effekte von einzelnen microRNAs**

MiR-155 wurde bereits als ein bedeutender Regulator bei entzündlichen Bedingungen wie Infektionen und immunologischen Erkrankungen identifiziert (Mahesh und Biswas 2019). Tatsächlich wurde eine proinflammatorische Achse zwischen miR-155 und NF- $\kappa$ B beschrieben. Dabei induziert NF- $\kappa$ B die Expression von miR-155, welches *Suppressor Of Cytokine Signaling* (SOCS) Proteine herunterreguliert, was zu einer Hemmung des negativen Rückkopplungsmechanismus führt und damit weiterhin zu einer erhöhten Expression von NF- $\kappa$ B. Durch diese miRNA ergibt sich eine Verbindung zwischen entzündlichen Signalwegen und dem Arzneistoffmetabolismus in der Leber. Die Transfektion von miR-155 in HepaRG-Zellen zeigte breitgefächerte negative Auswirkungen auf ADME-Gene wie z. B. CYPs und CAR (*NR1I3*) (Abb. 26). Interessanterweise zeigte miR-155 nicht nur Auswirkungen auf die vorhergesagten

Targets, sondern auch auf andere CYPs (Abb. 28). Bereits bei geringen Konzentrationen von miR-155 waren Effekte auf CYP-Aktivitäten zu sehen (Abb. 29). Es ist nicht auszuschließen, dass miR-155 weitere Bindestellen in ADME-Genen besitzt, die aber nicht durch TargetScan vorhergesagt worden waren. Natürlich könnte miR-155 auch durch seine pleiotropen Funktionen in inflammatorischen Prozessen andere Mechanismen der Herunterregulierung wie z. B. NF- $\kappa$ B und NR verstärken (Gerbai-Chaloin et al. 2013; Abualsunun und Piquette-Miller 2017). In einem *in vivo* Modell konnte die Regulation von orthologen Maus-CYPs durch die leberspezifische Überexpression von miR-155 gezeigt werden, was die hier erhaltenen Ergebnisse in HepaRG-Zellen unterstützt. Außerdem war die miR-155-Expression in zirrhotischen Lebern im Vergleich zu Kontrolllebern erhöht und zeigte eine negative Korrelation mit der CYP3A4 Aktivität ( $r = -0,5$ ). Dies könnte eine negative Regulation von CYP3A4 durch miR-155 bestätigen (Vuppalanchi et al. 2013). Auch in den hier ausgewählten und untersuchten Leberproben ( $n = 34$ ) waren negative Korrelationen zwischen miR-155 und verschiedenen CYPs auf RNA-, Protein und Aktivitätsebene zu sehen. So zeigten z. B. CYP1A2 und CYP2C19 starke negative Korrelationen mit miR-155 (Abb. 31). In CYP2C19 und CYP2C9 konnten Bindungsstellen für miR-155 validiert werden (Abb. 25). Entsprechend führte die Überexpression von miR-155 in HepaRG-Zellen sowohl auf mRNA- als auch auf Aktivitätsebene zu einer Abnahme von einigen CYPs (Abb. 26 und Abb. 28). Durch ihre zahlreichen Funktionen eignet sich miR-155 für zielgerichtete Therapien. Die Anwendung von Cobomarsen, einem miR-155-Inhibitor, wird momentan in klinischen Studien für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms getestet (Seto et al. 2018). Daher sollte bei der Entwicklung solcher Medikamente berücksichtigt werden, dass dadurch eventuell auch der Arzneistoffmetabolismus beeinflusst wird und sich ändern kann.

Die höchste exprimierte miRNA im CRP-Leberpool war miR-224-5p (Tab. 5), was im Zusammenhang mit ihrer Regulation durch NF- $\kappa$ B stehen könnte (Scisciani et al. 2012). Für diese miRNA konnte eine Bindestelle in CYP3A4 validiert werden (Abb. 25E). Allerdings führte die Transfektion von miR-224 zu einer Hochregulierung der CYP3A4 mRNA und einer Zunahme der Enzymaktivität nach 72 und 96 h (Abb. 26 und Abb. 28). Dies ist nicht ungewöhnlich, da miRNAs in bestimmten Fällen auch die Genexpression ihrer Targets stabilisieren bzw. aktivieren können (Vasudevan 2012). Beispielsweise erhöhte miR-369 die Expression von TNF- $\alpha$  in arretierten HEK293 Zellen (Vasudevan et al. 2007). Andererseits konnten Yu et al. (2018) zeigen, dass CYP3A4 mRNA und Protein nach 48 h durch die miR-224 Transfektion in HepaRG-Zellen abnahmen. Ein Grund für die unterschiedlichen Effekte könnte die Messung zu

verschiedenen Zeitpunkten sein. Eventuell führt miR-224 zu frühzeitigen Effekten, die im Gegensatz zu Effekten von miR-155 und miR-452 nach 72 und 96 h wieder verschwinden.

MiR-452 ist ein bekannter Tumorpromotor des hepatozellulären Karzinoms (Tang et al. 2017). CYP2C8 konnte im Gegensatz zu CYP3A4 als Target validiert werden (Abb. 26 und Abb. 28 und Abb. 25C). Die Transfektion von miR-452 führte in HepaRG-Zellen zu ähnlichen Effekten wie miR-155, was durch die Herunterregulierung von *NR1I3* (CAR) durch beide miRNAs erklärt werden könnte. Andererseits konnte CAR bisher für keine der beiden miRNAs als Target validiert werden. Eventuell könnte es daran liegen, dass in den Luciferase-Reporter-Assays nur kurze Sequenzen verwendet wurden und nicht die komplette 3'-UTR. Außerdem könnten im kodierenden Bereich von *NR1I3* Bindestellen für miRNAs liegen. Im Vergleich zu miR-155 zeigte miR-452 auch negative Effekte auf die Genexpression von *ARNT*, *CYP1A1* und *CYP1A2* (Abb. 26). Für diese Gene waren keine Bindestellen für miR-452 durch TargetScan vorhergesagt (Tab. 38). Allerdings ist nicht auszuschließen, dass diese Gene trotzdem Targets von miR-452 sind, da in diesen Genen Bindestellen durch andere Algorithmen vorhergesagt werden könnten.

Bei miR-6807 handelt es sich um eine neuere miRNA, über die bisher noch nicht so viel bekannt ist. Sie war als einzige miRNA in allen Krankheitspools der Leberbank und zudem auch in cytokinbehandelten HepaRG-Zellen dereguliert (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016, Kugler et al. 2019 und Abb. 32). CYP2C19 ist somit eines der ersten validierten Targets von miR-6807 (Abb. 26 und Abb. 25B). Da die Genexpression von CYP2C19 durch miR-6807 nicht stark betroffen war, dafür aber die Enzymaktivität, ist davon auszugehen, dass eine translationale Repression durch die miRNA in diesem Fall der bevorzugte Mechanismus ist.

MiR-543 hingegen zeigte keine negativen Effekte auf ADME-Gene in HepaRG-Zellen, obwohl Bindestellen in CYP2B6 und CYP2C19 vorhergesagt waren (Abb. 26, Abb. 28 und Tab. 39). Höchstwahrscheinlich war diese miRNA aus anderen Gründen in den Leberproben von Patienten mit erhöhtem CRP höher exprimiert, da es z. B. eine Rolle als Onkogen bei hepatozellulären Karzinomen spielt (Yu et al. 2014).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Effekte einzelner miRNAs auf ADME-Gene (Abnahme um 20-45 %) einen im Vergleich zu der Wirkung von Cytokinen (Abnahme bis zu 80 %) durchaus signifikanten Anteil bei der APR hatten. Eventuell ist davon auszugehen, dass miRNAs vor allem durch Netzwerke, an denen mehrere

miRNAs beteiligt sind, einen Beitrag zu der Herunterregulierung von ADME-Genen leisten.

### 4.3.2 MicroRNAs – stärker im Verbund?

Eine miRNA kann viele verschiedene Gene regulieren, andererseits kann ein Gen von mehreren miRNAs reguliert werden. Um zu überprüfen, ob miRNAs im Verbund stärkere Effekte auf ADME-Gene verursachen, wurden HepaRG-Zellen mit miRNA-Kombinationen transfiziert. Dabei sind kompetitive, aber auch additive und synergistische Interaktionen zwischen den miRNAs möglich. Bei kompetitivem Verhalten der miRNAs, wenn mehrere miRNAs um eine Bindestelle konkurrieren, kann es zu einer Abnahme der hemmenden Wirkung der miRNAs kommen. Im Gegensatz dazu können miRNAs mit unabhängigen Bindestellen den repressiven Effekt der einzelnen miRNAs erhöhen (Hua et al. 2006).

Im Vergleich zu den Einzelbehandlungen zeigten die Kombinationsbehandlungen allgemein stärkere Effekte, vor allem auf mRNA-Ebene (Abb. 26 und Abb. 27). Interessant ist, dass miR-6807 als Einzelbehandlung keine mRNA Effekte zeigte, während es in Kombination mit den zwei anderen miRNAs deren Wirkung sogar noch verstärkte. MiR-155 und miR-6807 führten zu synergistischen Effekten bei der CYP3A4 Aktivität (Abnahme um 40 % vs 33 %). Dieses Verhalten wurde auch bei der vaskulären Kalzifikation beobachtet, bei der miR-221 und miR-222 nur in Kombination eine Rolle spielten und allein keine Effekte zeigten. Diese miRNAs gehören zur gleichen miRNA-Familie und scheinen sich synergistisch auf die Transdifferenzierung von glatten Gefäßmuskelzellen auszuwirken (Mackenzie et al. 2014).

Bei CYP2B6 hingegen führten die Kombinationen mit miR-6807 und miR-155 zu einer Zunahme der mRNA bzw. Enzymaktivität, während miR-452 allein zu einer Abnahme der Aktivität führte (Abb. 26-30). Nur miR-6807 hatte eine vorhergesagte Bindestelle in CYP2B6. Eine kompetitive Interaktion zwischen den miRNAs könnte die eigentliche repressive Wirkung von miR-452 abgeschwächt haben. MiR-6807 und miR-155 könnten in diesem Fall falsch positive Regulatoren von CYP2B6 sein (Hua et al. 2006).

Bei CYP2C19 hatte die Kombination aus miR-155 und miR-6807 stärkere Effekte auf die Enzymaktivität (Abnahme um ca. 60 %) als die Einzelbehandlungen. Dies könnte daran liegen, dass beide miRNAs validierte Bindestellen in CYP2C19 haben (Abb. 25A-B). Faktoren wie zum Beispiel der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) werden ebenfalls von mehreren miRNAs reguliert. Die Kombination aus miR-20a und miR-361, die unabhängige Bindestellen in VEGF aufwiesen, zeigte additive Effekte im

Vergleich zu den Einzelbehandlungen in CNE Zellen (aus einem Nasopharynxkarzinom) (Hua et al. 2006). MiR-452 besitzt auch eine vorhergesagte Bindestelle in CYP2C19 (nicht getestet, da Context++ Score <50), allerdings zeigte miR-452 in Kombination mit den anderen miRNAs keinen Zusatzeffekt (Abb. 27).

MiR-452 und miR-6807 hatten beide eine vorhergesagte Bindestelle in CYP3A4, in Kombination führten sie zu einer stärkeren Abnahme der Enzymaktivität. Auch für Transporter konnten additive Effekte von miRNAs gezeigt werden, wie bei SLC15A1 für die Kombination von miR-27a und miR-193b (Bruckmueller et al. 2017).

Interessant ist auch, dass sich je nach Gen die Wirkung einer einzelnen miRNA durchsetzen konnte. Z. B. zeigten miR-155 und miR-6807 einzeln positive Effekte auf die *CYP1A1* und *CYP1A2* mRNA, während miR-452 zu einer Abnahme der mRNA führte. In Kombination war aber meistens die negative Wirkung von miR-452 dominant, während die Kombination aus miR-155 und miR-6807 zu einer Zunahme führte (Abb. 26 und Abb. 28). Auf Aktivitätsebene führte aber vor allem die Kombination mit miR-155 zu einer stärkeren Abnahme von CYP1A2. Abhängig von der jeweiligen miRNA könnte es zur Degradierung der mRNA (miR-452) bzw. Repression der Translation (miR-155) gekommen sein.

Durch die Kombinationsbehandlungen waren auch Phase II-Enzyme wie *GSTA2* und *GSTM1* viel stärker betroffen als bei Einzelbehandlungen (Abb. 26 und Abb. 28). Für diese Gene waren keine Bindestellen der untersuchten miRNAs vorhergesagt. Eventuell greifen die miRNAs in die Regulation dieser Gene ein, z. B. über *NR1I2* und *NR1I3*.

Auch als Biomarker für die Diagnose von Erkrankungen wird in der Regel eine Kombination aus mehreren miRNAs verwendet. Ein Set bestehend aus miR-221 und miR-29c wurde beispielsweise als diagnostischer Biomarker für das hepatozelluläre Karzinom identifiziert (Ji et al. 2018). Außerdem eignet sich ein spezifisches Set aus sieben miRNAs im Blut zur Diagnose von Sarkomen (Asano et al. 2019). Möglicherweise eignen sich miR-155 und miR-452 als Biomarker für entzündliche Bedingungen im Körper (Mi et al. 2013; Pua und Ansel 2015).

Je nach miRNA-Kombination kam es zu unterschiedlichen Effekten, die stärker bzw. schwächer als die Einzelbehandlungen waren. Durch ihre Fähigkeit, mehrere Gene zu adressieren, können miRNAs möglicherweise ADME-Gene als eine Gruppe funktionell ähnlicher Gene regulieren und somit stärkere Wirkungen zeigen (Hua et al. 2006).

MiRNAs können als regulatorische Netzwerke, z. B. bei Krebs, in Prozesse eingreifen (Plaisier et al. 2012). Daher ist es vorstellbar, dass miRNAs auch innerhalb eines inflammatorischen Netzwerks gemeinsam agieren, um ADME-Gene bei entzündlichen Bedingungen negativ zu beeinflussen.

Dieses Verhalten ist vor allem vorteilhaft bei Prozessen bzw. Veränderungen, in denen sich Zellen schnell anpassen müssen, um z. B. auf äußere Reize zu reagieren (Lauschke et al. 2017). Dies ist auch bei der APR der Fall, bei der es innerhalb von Stunden zu einer Reprogrammierung der Lebergenexpression kommt (Klein et al. 2015). Es ist davon auszugehen, dass solche breit angelegten Veränderungen durch eine koordinierte Expressionsveränderung bestimmter miRNA-Gruppen vermittelt werden, welche sich letztendlich auf die Proteinexpression auswirkt (Lauschke et al. 2017). Solche enormen Veränderungen während schneller Anpassungsprozesse scheinen ein allgemeingültiges biologisches Prinzip darzustellen, das auch andere Zelltypen betreffen kann (Hua et al. 2006; Bronevetsky et al. 2013; Lauschke et al. 2016; Lauschke et al. 2017). MiRNAs sind somit in der Lage, inflammatorische Netzwerke zu regulieren (Sonkoly und Pivarcsi 2009).

### **4.3.3 Beitrag von microRNAs zur negativen Akut-Phase-Reaktion**

In HepaRG-Zellen konnten die Auswirkungen von entzündungsassoziierten miRNAs als Einzel- und Kombinationseffekte auf ADME-Gene gezeigt werden. Damit waren diese miRNAs nicht nur bei Entzündung in der Leber hochexprimiert, sondern auch in der Lage, sich negativ auf ADME-Gene auszuwirken. Somit ist unter entzündlichen Bedingungen eine direkte bzw. indirekte Regulation über RXR $\alpha$ , wie oben diskutiert, von ADME-Genen durch miRNAs möglich (Abb. 26-31). Hierdurch bilden miRNAs eine zusätzliche Regulationsebene bei der Herunterregulierung von ADME-Genen. Hinzukommend können miRNAs auch über andere Signalwege (MAPK, JAK/STAT) eingreifen. Es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Signalwege auch gegenseitig miteinander verbunden sind, was zu komplexen Netzwerken führt (Smutny et al. 2013). MiRNAs könnten somit innerhalb eines inflammatorischen Netzwerkes an der Herunterregulierung der ADME-Gene beteiligt sein (Plaisier et al. 2012). Um die Bedeutung dieser miRNAs weiter zu untersuchen, könnten Studien mit Mäusen durchgeführt werden. Dafür eignen sich aber nur konservierte miRNAs bzw. Bindestellen. Außerdem könnten dabei nur Effekte auf homologe CYPs untersucht werden, da Mäuse viel mehr CYPs besitzen als Menschen (Nelson et al. 2004). Eine umfangreiche Mausstudie zu der leberspezifischen Auswirkung von miR-155 wurde bereits durchgeführt (Lin et al. 2015). Dort konnten einige negative Auswirkungen von

miR-155 auf ADME-Gene bestätigt werden. Jedoch bleibt abzuklären, ob dies sich auch im Menschen so verhält. Dafür würde sich ein Vergleich von Patienten, die einen erhöhten CRP-Spiegel aufweisen, mit gesunden Probanden eignen. In Serumproben könnte die Expression der entzündungsassoziierten miRNAs gemessen und verglichen werden. Durch die Gabe eines bereits getesteten Medikamentencocktails, der spezifische CYP-Substrate in niedrigen Dosen beinhaltet, könnten die Auswirkungen auf die CYP-Aktivität untersucht werden. Dabei wird die Metabolisierungsrate der Substrate, z. B. von Codein, Koffein und Torasemid, im Blut massenspektrometrisch gemessen (Kuepfer et al. 2014). Es könnte analysiert werden, ob die Expression von entzündungsassoziierten miRNAs *in vivo* mit diesen CYP-Enzymaktivitäten negativ korrelieren. Allerdings war unklar, ob die entzündungsassoziierten miRNAs von Makrophagen sezerniert oder durch inflammatorische Signalkaskaden in Hepatozyten hochreguliert wurden.

### 4.4 Herkunft von entzündungsassoziierten microRNAs

Um die Herkunft der entzündungsassoziierten miRNAs in Hepatozyten zu untersuchen, wurden verschiedene Strategien verfolgt: Die Induktion von miRNAs in Hepatozyten durch Cytokine und die Unterdrückung der Wirkung von endogenen miRNAs durch Antagomirs und AF.

#### 4.4.1 Induktion von entzündungsassoziierten miRNAs durch Cytokine in Hepatozyten?

Cytokine wie IL-6 und IL-1 $\beta$  sind wichtige Faktoren bei der Herunterregulierung von ADME-Genen (Aitken et al. 2006). Daher sollte in HepaRG-Zellen untersucht werden, ob durch Cytokinbehandlungen miRNAs induziert werden, welche ADME-Gene negativ beeinflussen könnten. MiR-3613-5p war die am stärksten hochregulierte miRNA durch IL-6 nach 24 h (Abb. 32). Diese miRNA war bereits in einer klinischen Studie als potentieller Biomarker für den immunpathologischen Status bei der Infektion mit *Plasmodium falciparum* identifiziert sowie mit akuter viraler Hepatitis assoziiert worden (Li et al. 2018; Singh et al. 2018). MiR-365b-5p zeigte bei IL-1 $\beta$ -behandelten Zellen die höchste Hochregulierung. Diese miRNA scheint eine Rolle bei der Tumorpromotion des hepatozellulären Karzinoms zu spielen (Tian et al. 2019). Beide miRNAs besitzen vorhergesagte Bindestellen in ADME-Genen, z. B. in CYP2B6 und CYP2C19 (TargetScan). Interessanterweise zeigte miR-122, eine der höchst exprimierten leberspezifischen miRNAs, keine Regulation durch Cytokine in den untersuchten HepaRG-Zellen. Lukowski et al. (2015) behandelten HepG2, PHH und Maushepatozyten mit IL-6 und stellten auch keine Veränderung von miR-122 fest.

Lukowski et al. (2015) sahen eine Hochregulierung von miR-19a, -21, -34c, -92b, -126, -181a, -455, -500b, -3177 und -3662 nach 24 h durch IL-6, was auch in den hier untersuchten IL-6-behandelten HepaRG-Zellen der Fall war. Somit konnte die Induktion von ähnlichen miRNAs wie in HepG2, PHH und Maushepatozyten in HepaRG-Zellen bestätigt werden. Rieger et al. (2013) assoziierten miR-34a, -21, -18b, -200c bereits mit Entzündung in Lebergewebe von Patienten mit erhöhtem CRP. MiR-31, -34a, -455, -27a,-19a/b, -21, -221 und -200c wurden durch Rieger et al. (2013) auch mit Cholestase assoziiert. MiR-301a gehört zu der miR-130 Familie und besitzt somit die gleiche Seed-Sequenz wie miR-130b. Daher könnte diese miRNA die gleichen Targets wie miR-130b, z. B. ADME-Gene, regulieren (Rieger et al. 2015). Einige hochregulierte miRNAs wie miR-34a und -34c gehören zur miR-34 Familie. Diese miRNA-Familie spielt bei der Krebsentstehung eine Rolle (Hermeking 2010). Die Regulation von RXR $\alpha$  durch miR-34a konnte bereits durch Oda et al. (2014) gezeigt werden. Außerdem ist diese miRNA mit Entzündung und Cholestase assoziiert (Rieger et al. 2013). In einem Mausmodell konnte auch die Induzierbarkeit von miR-455 durch LPS in dendritischen Zellen nachgewiesen werden (Dueck et al. 2014). Ebenso beobachteten Duan et al. (2016) eine Induktion von miR-455 durch TNF- $\alpha$  in humanen Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC). Des Weiteren konnte die Induktion von miR-146b durch LPS in Monozyten bestätigt werden (Taganov et al. 2006). Weitere Beispiele sind miR-21 und miR-140, die durch Cytokine in HepaRG-Zellen hochreguliert und auch in Mauslungen durch LPS-Behandlung induzierbar waren (Moschos et al. 2007). Für miR-365 konnte eine Regulation durch IL-1 $\beta$  über NF- $\kappa$ B in artikulären Chondrozyten gezeigt werden (Yang et al. 2016). Außerdem scheint miR-365 ein negativer Regulator von IL-6 zu sein (Xu et al. 2011; Lin et al. 2016). Bei Sepsis kommt es zu einer Hochregulierung von miR-27a in Mauslungen, wobei diese proinflammatorisch wirkt (Wang et al. 2014). MiR-19a verstärkt die Wirkung des JAK-STAT-Signalwegs, der durch Cytokine aktiviert wird (Collins et al. 2013).

Letztlich bestätigen und erweitern die hier identifizierten miRNAs vorherige Arbeiten, was die Rolle von miRNAs bei Entzündung unterstreicht, da miRNAs durch Cytokine in Hepatozyten induziert werden können. Allerdings zeigten die Cytokinbehandlungen eine Überlappung von ca. 48 % (n-fachen Änderung  $\pm 1,5$ ). Daraus lässt sich folgern, dass die Induktion von miRNAs cytokinabhängig ist.

Die in HepaRG-Zellen identifizierten, differenziell exprimierten miRNAs wurden mit den bereits entzündungsassoziierten miRNAs aus Lebergewebe verglichen (Masterarbeit Nicole Kugler, 2016; Kugler et al. 2019) (Abb. 33). Die elf gemeinsamen miRNAs (FC



$\pm 1,5$ ), die sich daraus ergeben, verhielten sich aber gegenteilig. Bereits identifizierte miRNAs wie miR-155 waren in HepaRG-Zellen nach 24 h nicht induziert. Gründe für die geringe Überschneidung zwischen den Gruppen könnten die verschiedenen Probenmaterialien gewesen sein. Lebergewebe besteht nicht nur aus Hepatozyten, sondern auch aus Blutzellen, Gallengängen, Kupffer-Zellen etc., während HepaRG-Zellen eine Mischung aus Hepatozyten und biliären Zellen darstellen (Godoy et al. 2013; Gripon et al. 2002). Außerdem standen Patienten mit erhöhtem CRP höchstwahrscheinlich nicht nur unter dem Einfluss von einem einzelnen Cytokin, sondern einer Kombination aus verschiedenen Cytokinen. Eventuell kann diese Kombination andere miRNAs induzieren als einzelne Cytokine allein. CRP zirkuliert zudem länger im Blut als Cytokine und ist somit länger detektierbar (Pepys und Hirschfield 2003). Die miRNA-Expression ist abhängig von der Zeit. Als Zeitpunkt wurden 24 h in Anlehnung an Lukowski et al. (2015) gewählt. Zu einem anderen Zeitpunkt könnte natürlich eine ganz andere Überschneidung mit den CRP-assoziierten miRNA-Kandidaten auftreten. Peng et al. (2018) konnte zeigen, dass 12 h nach LPS-Stimulation der beste Zeitpunkt für die Detektion von miR-155 in Rattenmakrophagen ist. MiRNAs können somit zu unterschiedlichen Zeitpunkten induziert sein und auch eventuell nur über einen kurzen Zeitraum, abhängig der jeweiligen Lebensdauer der miRNA (Taneja et al. 2019).

MiR-766 scheint eine entzündungsrelevante miRNA zu sein, da sie in allen Gruppen hochreguliert war und einige ADME-Gene wie CYP2B6, CYP2C19 und RXR $\alpha$  als Targets besitzt. Weitere Untersuchungen wie miRNA-Mimic-Behandlungen in HepaRG-Zellen könnten dies klären.

Um die Herkunft der entzündungsassoziierten miRNAs weiter zu untersuchen, könnten frühere Zeitpunkte bei cytokinbehandelten HepaRG-Zellen analysiert werden, um die Dynamik der miRNA-Population abzuschätzen.

Die Induktion der hier untersuchten entzündungsassoziierten miR-130b, miR-155, miR-224, miR-452 und miR-6807 durch Cytokine wurde in HepG2- und Huh7-Zellen untersucht. Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz bei Plasmiden in HepaRG-Zellen wurden diese beiden Zellmodelle verwendet. Die Zellen wurden mit Luciferase-Konstrukten der validierten Bindestellen transfiziert und gleichzeitig mit Cytokinen behandelt (Abb. 34 und Abb. 35). Es kam nach 48 h zu keiner signifikanten Abnahme der Luciferaseaktivität. Möglicherweise werden die untersuchten miRNAs nicht in Hepatozyten hochreguliert. Eventuell könnte aber auch der Zeitpunkt (48 h) zu spät gewählt worden sein, um die Bindung der entzündungsassoziierten miRNAs an die

Bindestellen zu detektieren. Ein weiterer Grund könnte sein, dass es innerhalb der Zellen zu einer hohen Plasmidexpression kam, während die cytokinininduzierte miRNA Menge sehr gering war und nicht ausreichte, um zu einer signifikanten Abnahme der Luciferaseaktivität zu führen. Huh7- und HepG2-Zellen könnten eventuell nicht die geeigneten Modelle gewesen sein, da es sich um Leberkrebszelllinien handelt, die nicht metabolisch aktiv sind und eine andere miRNA-Population aufweisen könnten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die entzündungsassoziierten miRNAs auch von anderen Zellen wie z. B. Immunzellen ausgeschüttet werden können und dann erst in die Hepatozyten gelangen. Die Produktion von miR-155 und miR-130b konnte bereits in Makrophagen nachgewiesen werden (Tili et al. 2007; Zheng et al. 2018). Klinische Studien könnten klären, ob diese miRNAs im Serum von Patienten mit erhöhtem CRP im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht sind.

### **4.4.2 Wirkung von endogenen microRNAs bei der Akut-Phase-Reaktion**

Um den Gesamtbeitrag endogener miRNAs zur negativen APR in Hepatozyten zu untersuchen, wurden sowohl Antagomir-Transfektionen gegen entzündungsassoziierte miRNAs durchgeführt als auch ein miRNA-Biogenese-Inhibitor (AF) verwendet, um die Funktion von cytokinininduzierten miRNAs zu unterbinden.

Bei den Antagomir-Transfektionen in HepaRG-Zellen waren bei entsprechender Inhibierung der endogenen miRNA positive Effekte auf ADME-Gene zu erwarten gewesen. Dennoch waren keine Effekte, unabhängig von den verwendeten Konzentrationen, sichtbar (Abb. 36). Ein Problem könnte gewesen sein, dass die untersuchten miRNAs nicht in ausreichenden Mengen in HepaRG-Zellen exprimiert waren, da diese möglicherweise erst durch Cytokine induziert bzw. von Immunzellen sekretiert werden müssen, um von außen in die Hepatozyten zu gelangen. Ein experimenteller Ansatz wäre die Behandlung von HepaRG-Zellen mit Cytokinen und der gleichzeitigen Transfektion von Antagomirs, die gegen entzündungsassoziierte miRNAs gerichtet sind. So könnte der Beitrag dieser miRNAs analysiert werden.

AF ist ein RISC-Inhibitor und verhindert die Bindung zwischen miRNA und dem RISC (Watashi et al. 2010; Lauschke et al. 2016). Durch Zugabe von AF sollte daher die Beteiligung der endogenen miRNAs an der APR unterbunden werden. Dadurch können miRNAs nicht mehr post-transkriptionell wirken und ihre Ziel-mRNAs werden nicht mehr degradiert bzw. weiter in Protein translatiert. Im Gegensatz dazu war eine Zunahme der Transkript- und Proteinmenge bzw. eine Aktivitätssteigerung für die Zielgene im Vergleich zur APR ohne AF zu erwarten gewesen.

Aufgrund der Ergebnisse von Lauschke et al. (2016) in PHH wurde 2  $\mu\text{M}$  AF in den Versuchen verwendet. Allerdings hatte AF allein in HepaRG-Zellen schon eine zeitabhängige Wirkung auf CYPs (Abnahme der CYP-Aktivitäten um ca. 80 % bei 2  $\mu\text{M}$  nach 72 h) (Abb. 37, Abb. 43 und Abb. 44). Ab 10  $\mu\text{M}$  kam es bereits nach 24 h zu einer starken Reduzierung der CYP-Aktivitäten, wobei die Zellviabilität nur noch 50 % betrug (Abb. 44 und Abb. 41). Lauschke et al. (2016) sahen zwar nach 4 h keine Zelltoxizität durch AF, allerdings war die Zellviabilität nach 24 h auf 70 % bei der niedrigsten AF Konzentration (2  $\mu\text{M}$ ) reduziert. In den hier untersuchten HepaRG-Zellen war nach 24 h keine Abnahme der Zellviabilität zu sehen, jedoch betrug unabhängig von beiden verwendeten Zellviabilitätsassays die Zellviabilität nur noch ca. 70 % nach 72 h (Abb. 41). Während der LDH-Assay eine Abnahme der Zellviabilität sowohl bei cytokin- als auch bei kombibehandelten Zellen zeigte, waren beim Alamar-Blue-Assay keine signifikanten Auswirkungen auf die Zellviabilität sichtbar (Abb. 42). Daher kann davon ausgegangen werden, dass 2  $\mu\text{M}$  AF auch in Kombination mit Cytokinen nicht cytotoxisch war, sondern erst bei höheren Konzentrationen.

Trotzdem kann dies nicht die enorme Abnahme der CYP-Aktivitäten unter 2  $\mu\text{M}$  AF erklären. Folgt man der ursprünglichen Überlegung, dass AF die Funktion der miRNAs bei der APR unterbindet, ergibt sich eine interessante Beobachtung. Bei dem Vergleich der jeweiligen Cytokinbehandlungen mit ihrer Kontrollbehandlung fällt auf, dass die AF/IL-6-Behandlung im Vergleich zu ihrer Kontrolle AF/PBS zu keiner signifikanten Abnahme der CYP-Aktivitäten führte (Abb. 38). Dieses Verhalten bzw. Muster war auch für CYP2C9 auf Proteinebene zu sehen (Abb. 39). Bei der normalen APR führte IL-6 aber zu einer starken Reduzierung der CYP-Aktivitäten. AF verhinderte spezifisch für IL-6 die Abnahme der CYPs. Allerdings kann die Wirkung von AF nicht allein für die Unterbindung der miRNA-Funktion verantwortlich sein, da die AF/IL-6-Behandlung die Abnahme der CYP3A4 Aktivität komplett verhinderte (Abb. 38). Dies war nicht zu erwarten, weil davon ausgegangen wurde, dass miRNAs bei der Herunterregulierung von ADME-Genen nur einen Faktor von vielen darstellen. Außerdem waren nach 24 h keine signifikanten Unterschiede zwischen den AF/Cytokin- und Cytokinbehandlungen auf Genexpressionsebene zu sehen (Abb. 40). Da AF ähnliche Effekte wie Ruxolitinib, einem JAK1/2-Inhibitor, auf CYPs zeigte, könnte es auch in den JAK/STAT-Signalweg eingreifen, wobei sich die Effekte erst zu späteren Zeitpunkten zeigten (Febvre-James et al. 2018). AF scheint zudem die Aktivierung von NF- $\kappa\text{B}$  zu verhindern (Kim et al. 1998; Choi et al. 2000). Des Weiteren ist AF ein Inhibitor des Hypoxie-induzierten Faktors-1 (HIF-1) (Lee et al. 2009). HIF-1 wird unter anderem von Cytokinen wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  stimuliert (Frede et al. 2007). Allerdings kam es nur bei IL-6 zu einer

spezifischen Wirkungsunterbindung durch AF. Daher ist eher von einem Mechanismus über JAK/STAT auszugehen.

Um den Gesamtbeitrag der miRNAs weiter zu untersuchen, könnte statt der Behandlung mit AF ein Knockdown eines Faktors, der bei der miRNA-Reifung eine Rolle spielt, durchgeführt werden. Der Knockout des AGO2-Proteins sowie Dicer1 sind letal in Mausembryonen (Liu et al. 2004). Die Leberfunktion war jedoch durch den leberspezifischen KO von Dicer1 nur geringfügig eingeschränkt. Mit fortschreitendem Alter der Mäuse kam es aber zu Leberschäden und Entzündung (Hand et al. 2009). Ähnlich wie bei einem Verlust von  $\beta$ -Catenin war die Leberzonierung gestört (Sekine et al. 2009).

### 4.4.3 Rolle von Acriflavin – ein CYP-Inhibitor?

AF scheint nicht nur in die miRNA-Biogenese einzugreifen, sondern auch Auswirkungen auf CYPs zu haben (Abnahme der CYP-Aktivitäten unter AF/PBS im Vergleich zur Kontrollbehandlung) (Abb. 37). Um diese Effekte von AF auf CYPs zu untersuchen, wurde die Genexpression von einigen ADME-Genen nach 6 und 24 h analysiert. Für 1 und 2  $\mu$ M AF waren kaum Effekte zu sehen, außer für *CYP2B6*, *CYP2C19*, *ABCC2*, *ABCG2* und *NR1I2* (Abb. 43). Erst bei 5  $\mu$ M AF kam es vor allem nach 24 h zu einer starken Herunterregulierung einiger ADME-Gene. Die Zellviabilität für 5  $\mu$ M war aber nach 24 h nicht reduziert (Abb. 41B). Wiederholte Behandlungen mit AF führten allerdings nach 72 h zu Zelltoxizität  $\geq 5 \mu$ M.

Um eine direkte Inhibition von CYPs zu untersuchen, wurden humane Lebermikrosomen mit verschiedenen AF-Konzentrationen behandelt. Zwar war eine konzentrationsabhängige Abnahme der Aktivitäten für die meisten CYPs sichtbar, die aber bei 100  $\mu$ M nur 20-40 % betrug (Abb. 45). Daher kann nicht von einer direkten CYP-Inhibition durch AF ausgegangen werden. Da in HepaRG-Zellen aber nach 72 h sämtliche CYP-Aktivitäten bei 2  $\mu$ M reduziert waren, könnte es sein, dass AF in den Zellen akkumuliert oder durch CYPs ein Metabolit entsteht, der sich über die Zeit negativ auf die CYP-Aktivität auswirkt. Ein Beispiel für Produktinhibition ist Gemfibrozil, ein Lipidsenker, dessen Metabolit Gemfibrozilglucuronid sich negativ auf CYP2C8 in PHH auswirkte, während in humanen Lebermikrosomen keine Inhibition zu sehen gewesen war (Parkinson et al. 2010). Dies könnte eventuell auch bei AF der Fall sein. Nach 24 h waren in HepaRG-Zellen mehrere Phase II-Enzyme, u.a. die Glutathion-S-Transferasen A2 (*GSTA2*) und M1 (*GSTM1*), bei  $<5 \mu$ M AF herunterreguliert, was eine negative Rückkopplung auf die potenzielle Metabolitenbildung sein könnte (Abb. 43). Andererseits könnte die Akkumulation von AF im Nukleus und die Interkalation in DNA

zu einer Produktion von ROS führen (Gatasheh et al. 2017). ROS können kovalent an CYPs binden und somit zu einer irreversiblen Inhibition der CYPs führen (Pelkonen et al. 2008).

AF könnte aber auch in die Regulation der CYPs eingreifen, da nach 72 h das CYP2C9 Protein durch AF/PBS im Vergleich zur PBS-Kontrolle reduziert war und 5 µM AF bereits nach 24 h starke Effekte auf CYP-Regulatoren wie *NR1I2* und *NR1I3* zeigte (Abb. 39 und Abb. 43). In einem Rattenmodell kam es unter AF zur Abnahme von einigen CYPs wie CYP2B1/2, CYP2C11 und CYP3A1/2. CYP1A2 und CYP1E2 blieben hingegen unverändert (Kim et al. 1998). Kim et al. (1998) vermuteten, dass AF die Funktion von membranassoziierten Proteinen wie z. B. die Proteinkinase C (PKC) störte, da es in die Integrität der Zellmembran eingreifen kann. Dadurch könnte eventuell eine ganze Palette an Genen betroffen sein, die normalerweise durch nukleäre TF reguliert werden (Kim et al. 1998). AF wurde darüber hinaus als PKC-Inhibitor identifiziert (Hannun und Bell 1988). PKC ist über AhR an der Regulation von CYP1A1 beteiligt. Einerseits nahm CYP1A1 in einer Rattenleberzelllinie durch die Behandlung verschiedener PKC-Inhibitoren wie Calphostin C und Staurosporin ab (Pascale et al. 2009). Andererseits phosphoryliert PKC PXR, was zu einer Unterdrückung der induzierbaren CYP-Expression führt (Pondugula et al. 2009). Eine Inhibierung der PKC würde in diesem Fall aber eher zu einem Anstieg der induzierbaren CYP-Expression führen, was aber nicht der Fall war. Daher ist die Rolle von PKC bei der AF-vermittelten Abnahme der CYPs nicht eindeutig geklärt. Um zu klären, ob die Effekte von AF auf ADME-Gene hauptsächlich über die Inhibierung von Proteinkinase C entstehen, könnte die Wirkung mit der eines Proteinkinase-C-Inhibitors verglichen werden.

Letztendlich ist davon auszugehen, dass AF eine indirekte, langsame und konzentrationsabhängige Wirkung auf CYPs hat, was durch die oben genannten Mechanismen möglich sein könnte.

### **4.5 Potenzielle Biomarker: MicroRNAs als frühe Prädiktoren für das Ansprechen von Medikamenten bei Entzündung?**

Der Bedarf an Biomarkern, um den Einfluss von Entzündung auf den Arzneistoffmetabolismus in Patienten vorherzusagen, ist groß, da es bisher noch keinen gibt, der im Blut gemessen werden kann (Morgan 2009). Aufgrund ihrer guten Stabilität im Blut eignen sich miRNAs als Biomarker (Chen et al. 2008; Starkey Lewis et al. 2012). Bisher werden sie vor allem bei der Diagnose von Krebs eingesetzt (Mitchell et al. 2008). Durch klinische Studien mit Patienten, die eine akute Entzündung

bzw. einen erhöhten CRP-Wert haben, könnte überprüft werden, ob die identifizierten entzündungsassoziierten miRNAs sich als Biomarker bei Entzündung eignen. Dadurch könnte man eventuell die inflammatorischen Auswirkungen auf den Arzneistoffmetabolismus abschätzen. Sehr spekulativ wäre eine Anwendung von miRNA-Antagomirs, welche die induzierten miRNAs abfangen, um eine Herunterregulierung der ADME-Gene durch miRNAs zu verhindern. Die Entgiftungsfähigkeit der Leber bliebe somit auch bei entzündlichen Prozessen erhalten, was das Risiko für Nebenwirkungen bzw. Toxizitätserscheinungen durch eingenommene Medikamente reduzieren würde. Für miR-155 gibt es bereits den Inhibitor Cobomarsen (MRG-106), welcher momentan in klinischen Studien getestet wird (Seto et al. 2018).

### 4.6 Fazit und Ausblick

Der eingeschränkte Arzneistoffmetabolismus bei Entzündung kann zu drastischen Folgen bei Patienten führen. Bei der damit verbundenen Herunterregulierung der ADME-Gene sind zahlreiche Faktoren wie NR und miRNAs beteiligt, welche in einem komplexen Netzwerk interagieren.

Die Auswahl bzw. Verfügbarkeit eines geeigneten Zellmodells zur Untersuchung des Arzneistoffmetabolismus ist von großer Wichtigkeit, um Fragestellungen gezielt beantworten zu können. KHH wiesen nicht die erwarteten Eigenschaften auf und waren daher für die hier untersuchten Fragestellungen nicht geeignet. HepaRG-Zellen bewiesen sich hingegen als ein robustes hepatisches Zellmodell zur Untersuchung von miRNA-Effekten mit wenigen Limitationen.

Es konnte gezeigt werden, dass NR und RXR $\alpha$  große Einflussfaktoren bei der Herunterregulierung der ADME-Gene darstellen. Sie könnten aber eventuell durch ihre allgemeine Rolle nur an der Herunterregulierung von induzierbaren CYPs beteiligt sein. MiRNAs hingegen bilden eine neuartige Regulationsebene in der Herunterregulierung der ADME-Gene, die bisher nicht genau untersucht worden war. Es wurden entzündungsassoziierte miRNAs identifiziert sowie funktionale miRNA-Bindestellen in ADME-Genen validiert. Diese miRNAs können ADME-Gene sowohl direkt als auch indirekt über RXR $\alpha$  negativ regulieren. Diese Daten unterstreichen die Rolle von miRNAs bei der Herunterregulierung von ADME-Genen. Außerdem bieten sie ein Angriffsziel zur Gegensteuerung der Herunterregulierung. Demnach könnten miRNA-Antagomirs medikamentöse Therapien entscheidend stärken, indem sie die Toxizitätseffekte durch Medikamente reduzieren.

Dennoch sind einige Fragen bisher noch nicht vollständig geklärt. Der Gesamtbeitrag der miRNAs an der Herunterregulierung der ADME-Gene konnte noch nicht genau erfasst werden. Außerdem konnte nicht endgültig geklärt werden, woher die entzündungsassoziierten miRNAs stammen. Korrelationsanalysen lassen zwar eine negative Regulation einiger ADME-Gene in der Leber durch diese miRNAs vermuten. Allerdings ist letztendlich nicht bekannt, wie hoch die Konzentrationen der entzündungsassoziierten miRNAs *in vivo* in der Leber und ob diese ausreichend sind, um ADME-Gene bei Entzündung negativ zu regulieren. Einige dieser Fragen könnten mithilfe klinischer Studien oder Ko-Kultur Modellen geklärt werden.





## Literaturverzeichnis

- Abualsunun, Walaa A.; Piquette-Miller, Micheline (2017): Involvement of Nuclear Factor  $\kappa$ B, not Pregnane X Receptor, in Inflammation-Mediated Regulation of Hepatic Transporters. *Drug Metab Dispos* 45 (10), 1077–1083.
- Agarwal, Vikram; Bell, George W.; Nam, Jin-Wu; Bartel, David P. (2015): Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4.
- Aitken, Alison E.; Richardson, Terrilyn A.; Morgan, Edward T. (2006): Regulation of drug-metabolizing enzymes and transporters in inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 123–149.
- Aitken, Alison E.; Lee, Choon-Myung; Morgan, Edward T. (2008): Roles of nitric oxide in inflammatory downregulation of human cytochromes P450. *Free Radic Biol Med* 44 (6), 1161–1168.
- Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (4), 783–801.
- Akiyama, Taro E.; Gonzalez, Frank J. (2003): Regulation of P450 genes by liver-enriched transcription factors and nuclear receptors. *Biochim Biophys Acta* 1619 (3), 223–234.
- Alam, T.; An, M. R.; Papaconstantinou, J. (1992): Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response. *J Biol Chem* 267 (8), 5021–5024.
- Ambros, Victor; Bartel, Bonnie; Bartel, David P.; Burge, Christopher B.; Carrington, James C.; Chen, Xuemei et al. (2003): A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9 (3), 277–279.
- Andersson, Tommy B.; Kanebratt, Kajsa P.; Kenna, John Gerry (2012): The HepaRG cell line. A unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8 (7), 909–920.
- Aninat, Caroline; Piton, Amélie; Glaise, Denise; Le Charpentier, Typhen; Langouët, Sophie; Morel, Fabrice et al. (2006): Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 34 (1), 75–83.
- Anthérieu, Sébastien; Chesné, Christophe; Li, Ruoya; Camus, Sandrine; Lahoz, Agustín; Picazo, Laura et al. (2010): Stable expression, activity, and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 38 (3), 516–525.
- Anthérieu, Sébastien; Azzi, Pamela Bachour-El; Dumont, Julie; Abdel-Razzak, Ziad; Guguen-Guillouzo, Christiane; Fromenty, Bernard et al. (2013): Oxidative stress plays a major role in chlorpromazine-induced cholestasis in human HepaRG cells. *Hepatology* 57 (4), 1518–1529.
- Anzenbacher, Pavel; Anzenbacherová, Eva (2012): Drug-Metabolizing Enzymes - An Overview. In: Pavel Anzenbacher und Ulrich M. Zanger (Hg.): *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 3–25.
- Anzenbacher, Pavel; Zanger, Ulrich M. (2012): *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Applied Biosystems (2010): Introduction to Gene Expression. Getting Started Guide (PN 4454239A). Online verfügbar unter [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms\\_083618.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_083618.pdf).
- Asano, Naofumi; Matsuzaki, Juntaro; Ichikawa, Makiko; Kawauchi, Junpei; Takizawa, Satoko; Aoki, Yoshiaki et al. (2019): A serum microRNA classifier for the diagnosis of sarcomas of various histological subtypes. *Nat Commun* 10 (1), 1299.

- Assenat, Eric; Gerbal-Chaloin, Sabine; Larrey, Dominique; Saric, Jean; Fabre, Jean-Michel; Maurel, Patrick et al. (2004): Interleukin 1 $\beta$  inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance. *Hepatology* 40 (4), 951–960.
- Bachmann, Anastasia; Moll, Matthias; Gottwald, Eric; Nies, Cordula; Zantl, Roman; Wagner, Helga et al. (2015): 3D Cultivation Techniques for Primary Human Hepatocytes. *Microarrays* 4 (1), 64–83.
- Badolo, Lassina; Trancart, Marie Michèle; Gustavsson, Lena; Chesné, Christophe (2011): Effect of cryopreservation on the activity of OATP1B1/3 and OCT1 in isolated human hepatocytes. *Chem Biol Interact* 190 (2-3), 165–170.
- Baltimore, David; Boldin, Mark P.; O'Connell, Ryan M.; Rao, Dinesh S.; Taganov, Konstantin D. (2008): MicroRNAs. New regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* 9 (8), 839–845.
- Barclay, T. B.; Peters, J. M.; Sewer, M. B.; Ferrari, L.; Gonzalez, F. J.; Morgan, E. T. (1999): Modulation of cytochrome P-450 gene expression in endotoxemic mice is tissue specific and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  dependent. *J Pharmacol Exp Ther* 290 (3), 1250–1257.
- Barker, C. W.; Fagan, J. B.; Pasco, D. S. (1994): Down-regulation of P4501A1 and P4501A2 mRNA expression in isolated hepatocytes by oxidative stress. *J Biol Chem* 269 (6), 3985–3990.
- Bartel, David P. (2004): MicroRNAs. Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2), 281–297.
- Becares, Natalia; Gage, Matthew C.; Pineda-Torra, Inés (2017): Posttranslational Modifications of Lipid-Activated Nuclear Receptors. Focus on Metabolism. *Endocrinology* 158 (2), 213–225.
- Behm-Ansmant, Isabelle; Rehwinkel, Jan; Doerks, Tobias; Stark, Alexander; Bork, Peer; Izaurralde, Elisa (2006): mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 20 (14), 1885–1898.
- Beigneux, A. P.; Moser, A. H.; Shigenaga, J. K.; Grunfeld, C.; Feingold, K. R. (2000): The acute phase response is associated with retinoid X receptor repression in rodent liver. *J Biol Chem* 275 (21), 16390–16399.
- Beigneux, Anne P.; Moser, Arthur H.; Shigenaga, Judy K.; Grunfeld, Carl; Feingold, Kenneth R. (2002): Reduction in cytochrome P-450 enzyme expression is associated with repression of CAR (constitutive androstane receptor) and PXR (pregnane X receptor) in mouse liver during the acute phase response. *Biochem Biophys Res Commun* 293 (1), 145–149.
- Bell, Catherine C.; Hendriks, Delilah F. G.; Moro, Sabrina M. L.; Ellis, Ewa; Walsh, Joanne; Renblom, Anna et al. (2016): Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. *Sci Rep* 6, 25187.
- Berezikov, Eugene; Chung, Wei-Jen; Willis, Jason; Cuppen, Edwin; Lai, Eric C. (2007): Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28 (2), 328–336.
- Berezikov, Eugene (2011): Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat Rev Genet* 12 (12), 846–860.
- Berger, Benjamin; Donzelli, Massimiliano; Maseneni, Swarna; Boess, Franziska; Roth, Adrian; Krähenbühl, Stephan; Haschke, Manuel (2016): Comparison of Liver Cell Models Using the Basel Phenotyping Cocktail. *Front Pharmacol* 7.
- Betel, Doron; Wilson, Manda; Gabow, Aaron; Marks, Debora S.; Sander, Chris (2008): The microRNA.org resource. Targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36 (Database issue), D149-153.

- Betel, Doron; Koppal, Anjali; Agius, Phaedra; Sander, Chris; Leslie, Christina (2010): Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 11 (8), R90.
- Bhalla, Sonali; Ozalp, Cengiz; Fang, Sungsoon; Xiang, Lingjin; Kemper, Jongsook Kim (2004): Ligand-activated pregnane X receptor interferes with HNF-4 signaling by targeting a common coactivator PGC-1alpha. Functional implications in hepatic cholesterol and glucose metabolism. *J Biol Chem* 279 (43), 45139–45147.
- Bhattacharya, Anindya; Ziebarth, Jesse D.; Cui, Yan (2014): PolymiRTS Database 3.0. Linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Res* 42 (D1), D86-D91.
- Bohnsack, Markus T.; Czaplinski, Kevin; Gorlich, Dirk (2004): Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10 (2), 185–191.
- Bolley, Jennifer; Kock, Joery De; Rodrigues, Robim Marcelino; Vinken, Mathieu; Rogiers, Vera; Vanhaecke, Tamara (2015): MicroRNAs as key regulators of xenobiotic biotransformation and drug response. *Arch Toxicol* 89 (9), 1523–1541.
- Borchert, Glen M.; Lanier, William; Davidson, Beverly L. (2006): RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13 (12), 1097–1101.
- Bosscher, K. de; Vanden Berghe, W.; Haegeman, G. (2006): Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor κB. *Oncogene* 25 (51), 6868–6886.
- Bronevetsky, Yelena; Villarino, Alejandro V.; Easley, Christopher J.; Barbeau, Rebecca; Barczak, Andrea J.; Heinz, Gitta A. et al. (2013): T cell activation induces proteasomal degradation of Argonaute and rapid remodeling of the microRNA repertoire. *J Exp Med* 210 (2), 417–432.
- Broutier, Laura; Mastrogianni, Gianmarco; Verstegen, Monique Ma; Francies, Hayley E.; Gavarró, Lena Morrill; Bradshaw, Charles R. et al. (2017): Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat Med* 23 (12), 1424–1435.
- Bruckmueller, Henrike; Martin, Paul; Kähler, Meike; Haenisch, Sierk; Ostrowski, Marek; Drozdik, Marek et al. (2017): Clinically Relevant Multidrug Transporters Are Regulated by microRNAs along the Human Intestine. *Mol Pharm* 14 (7), 2245–2253.
- Cai, Xuezhong; Hagedorn, Curt H.; Cullen, Bryan R. (2004): Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10 (12), 1957–1966.
- Carcillo, Joseph A.; Doughty, Lesley; Kofos, Danny; Frye, Reginald F.; Kaplan, Sandra S.; Sasser, Howell; Burckart, Gilbert J. (2003): Cytochrome P450 mediated-drug metabolism is reduced in children with sepsis-induced multiple organ failure. *Intensive Care Med* 29 (6), 980–984.
- Carmell, Michelle A.; Hannon, Gregory J. (2004): RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11 (3), 214–218.
- Cerec, Virginie; Glaise, Denise; Garnier, Delphine; Morosan, Serban; Turlin, Bruno; Drenou, Bernard et al. (2007): Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor. *Hepatology* 45 (4), 957–967.
- Chang, K. C.; Bell, T. D.; Lauer, B. A.; Chai, H. (1978): Altered theophylline pharmacokinetics during acute respiratory viral illness. *Lancet* 1 (8074), 1132–1133.
- Chekulaeva, Marina; Filipowicz, Witold (2009): Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* 21 (3), 452–460.

- Chendrimada, Thimmaiah P.; Gregory, Richard I.; Kumaraswamy, Easwari; Norman, Jessica; Cooch, Neil; Nishikura, Kazuko; Shiekhattar, Ramin (2005): TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 (7051), 740–744.
- Chen, J. D.; Evans, R. M. (1995): A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377 (6548), 454–457.
- Chen, J. Q.; Ström, A.; Gustafsson, J. A.; Morgan, E. T. (1995): Suppression of the constitutive expression of cytochrome P-450 2C11 by cytokines and interferons in primary cultures of rat hepatocytes. Comparison with induction of acute-phase genes and demonstration that CYP2C11 promoter sequences are involved in the suppressive response to interleukins 1 and 6. *Mol Pharmacol* 47 (5), 940–947.
- Chen, Xi; Ba, Yi; Ma, Lijia; Cai, Xing; Yin, Yuan; Wang, Kehui et al. (2008): Characterization of microRNAs in serum. A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18 (10), 997–1006.
- Chiang, H. Rosaria; Schoenfeld, Lori W.; Ruby, J. Graham; Auyeung, Vincent C.; Spies, Noah; Baek, Daehyun et al. (2010): Mammalian microRNAs. Experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 24 (10), 992–1009.
- Choi, S. H.; Cho, J. Y.; Chung, Y. S.; Hong, E.; Han, Y.; Kim, S. G. (2000): Inhibition of lipopolysaccharide-induced I-kappaB degradation and tumor necrosis factor-alpha expression by acriflavine, an antimicrobial agent. *Int J Immunopharmacol* 22 (10), 775–787.
- Collins, Aideen S.; McCoy, Claire E.; Lloyd, Andrew T.; O'Farrelly, Cliona; Stevenson, Nigel J. (2013): miR-19a. An effective regulator of SOCS3 and enhancer of JAK-STAT signalling. *PLoS ONE* 8 (7), e69090.
- Cui, Wenqi; Sun, Mengxi; Galeva, Nadezhda; Williams, Todd D.; Azuma, Yoshiaki; Staudinger, Jeff L. (2015): SUMOylation and Ubiquitylation Circuitry Controls Pregnane X Receptor Biology in Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 43 (9), 1316–1325.
- Czekaj, Piotr; Skowronek, Rafa (2012): Transcription Factors Potentially Involved in Regulation of Cytochrome P450 Gene Expression. In: James Paxton (Hg.): *Pharmacogenetics and Metabolism. Past, Present and Future*: INTECH Open Access Publisher. Online verfügbar unter <https://www.intechopen.com/books/topics-on-drug-metabolism/transcription-factors-potentially-involved-in-regulation-of-cytochrome-p450-gene-expression>.
- Davis-Dusenbery, Brandi N.; Hata, Akiko (2010): Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *J Biochem* 148 (4), 381–392.
- Dean, Michael; Annilo, Tarmo (2005): Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 123–142.
- Deiuliis, J. A. (2016): MicroRNAs as regulators of metabolic disease. Pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. *Int J Obes* 40 (1), 88–101.
- Delaporte, E.; Renton, K. W. (1997): Cytochrome P4501A1 and cytochrome P4501A2 are downregulated at both transcriptional and post-transcriptional levels by conditions resulting in interferon-alpha/beta induction. *Life Sci* 60 (10), 787–796.
- Demazeau, Maxime; Quesnot, Nicolas; Ripoche, Nicolas; Rauch, Claudine; Jeftić, Jelena; Morel, Fabrice et al. (2017): Efficient transfection of Xenobiotic Responsive Element-biosensor plasmid using diether lipid and phosphatidylcholine liposomes in differentiated HepaRG cells. *Int J Pharm* 524 (1-2), 268–278.
- Denli, Ahmet M.; Tops, Bastiaan B. J.; Plasterk, Ronald H. A.; Ketting, René F.; Hannon, Gregory J. (2004): Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432 (7014), 231–235.

- Dickmann, Leslie J.; Patel, Sonal K.; Wienkers, Larry C.; Slatter, J. Greg (2012): Effects of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and IL-1 $\beta$ /interleukin 6 (IL-6) combinations on drug metabolizing enzymes in human hepatocyte culture. *Curr Drug Metab* 13 (7), 930–937.
- Diederichs, Sven; Haber, Daniel A. (2007): Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* 131 (6), 1097–1108.
- Ding, Xunshan; Staudinger, Jeff L. (2005): Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C. *Biochem Pharmacol* 69 (5), 867–873.
- Dluzen, Douglas F.; Lazarus, Philip (2015): MicroRNA regulation of the major drug-metabolizing enzymes and related transcription factors. *Drug Metab Rev* 47 (3), 320–334.
- Duan, Qiong; Mao, Xiaoxiao; Xiao, Yi; Liu, Zhenzhen; Wang, Yangui; Zhou, Haoyang et al. (2016): Super enhancers at the miR-146a and miR-155 genes contribute to self-regulation of inflammation. *Biochim Biophys Acta* 1859 (4), 564–571.
- Dueck, Anne; Eichner, Alexander; Sixt, Michael; Meister, Gunter (2014): A miR-155-dependent microRNA hierarchy in dendritic cell maturation and macrophage activation. *FEBS Lett* 588 (4), 632–640.
- Eichhorn, Stephen W.; Guo, Huili; McGeary, Sean E.; Rodriguez-Mias, Ricard A.; Shin, Chanseok; Baek, Daehyun et al. (2014): mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. *Mol Cell* 56 (1), 104–115.
- Eulenfeld, René; Dittrich, Anna; Khouri, Christina; Müller, Pia J.; Mütze, Barbara; Wolf, Alexandra; Schaper, Fred (2012): Interleukin-6 signalling. More than Jaks and STATs. *Eur J Cell Biol* 91 (6-7), 486–495.
- Evers, Raymond; Dallas, Shannon; Dickmann, Leslie J.; Fahmi, Odette A.; Kenny, Jane R.; Kraynov, Eugenia et al. (2013): Critical review of preclinical approaches to investigate cytochrome p450-mediated therapeutic protein drug-drug interactions and recommendations for best practices. A white paper. *Drug Metab Dispos* 41 (9), 1598–1609.
- Febvre-James, Marie; Bruyère, Arnaud; Le Vée, Marc; Fardel, Olivier (2018): The JAK1/2 Inhibitor Ruxolitinib Reverses Interleukin-6-Mediated Suppression of Drug-Detoxifying Proteins in Cultured Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 46 (2), 131–140.
- Feghali, C. A.; Wright, T. M. (1997): Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci* 2, d12-26.
- Feidt, Diana M.; Klein, Kathrin; Hofmann, Ute; Riedmaier, Stephan; Knobloch, Daniel; Thasler, Wolfgang E. et al. (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 (9), 1589–1597.
- Filella, X.; Blade, J.; Guillermo, A. L.; Molina, R.; Rozman, C.; Ballesta, A. M. (1996): Cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1alpha) and soluble interleukin-2 receptor as serum tumor markers in multiple myeloma. *Cancer Detect Prev* 20 (1), 52–56.
- Filipowicz, Witold; Bhattacharyya, Suvendra N.; Sonenberg, Nahum (2008): Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs. Are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9 (2), 102–114.
- Fisel, P.; Schaeffeler, E.; Schwab, M. (2016): DNA Methylation of ADME Genes. *Clin Pharmacol Ther* 99 (5), 512–527.
- Frede, Stilla; Berchner-Pfannschmidt, Utta; Fandrey, Joachim (2007): Regulation of Hypoxia-Inducible Factors During Inflammation. In: Bernhard Brüne und Helmut Sies (Hg.): Oxygen biology and hypoxia, Bd. 435. San Diego, Calif: Academic Press (Methods in Enzymology, v. 435), 403–419.

- Friedman, Robin C.; Farh, Kyle Kai-How; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19 (1), 92–105.
- Gatasheh, Mansour K.; Kannan, S.; Hemalatha, K.; Imrana, N. (2017): Proflavine an acridine DNA intercalating agent and strong antimicrobial possessing potential properties of carcinogen. *Karbala International Journal of Modern Science* 3 (4), 272–278.
- Geick, A.; Eichelbaum, M.; Burk, O. (2001): Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 276 (18), 14581–14587.
- Gerbai-Chaloin, Sabine; Iankova, Irena; Maurel, Patrick; Daujat-Chavanieu, Martine (2013): Nuclear receptors in the cross-talk of drug metabolism and inflammation. *Drug Metab Rev* 45 (1), 122–144.
- Gerets, H. H. J.; Tilmant, K.; Gerin, B.; Chanteux, H.; Depelchin, B. O.; Dhalluin, S.; Atienzar, F. A. (2012): Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol* 28 (2), 69–87.
- Ghose, Romi; Zimmerman, Tracy L.; Thevananther, Sundararajah; Karpen, Saul J. (2004): Endotoxin leads to rapid subcellular re-localization of hepatic RXR? A novel mechanism for reduced hepatic gene expression in inflammation. *Nucl Recept* 2 (1), 4.
- Ghose, Romi; Mulder, Jaap; Furstenberg, Richard J. von; Thevananther, Sundararajah; Kuipers, Folkert; Karpen, Saul J. (2007): Rosiglitazone attenuates suppression of RXRalpha-dependent gene expression in inflamed liver. *J Hepatol* 46 (1), 115–123.
- Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B. (1998): NF-kappa B and Rel proteins. Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225–260.
- Gieseck, Richard L.; Vallier, Ludovic; Hannan, Nicholas R. F. (2015): Generation of Hepatocytes from Pluripotent Stem Cells for Drug Screening and Developmental Modeling. *Methods Mol Biol* 1250, 123–142.
- Godoy, Patricio; Hewitt, Nicola J.; Albrecht, Ute; Andersen, Melvin E.; Ansari, Nariman; Bhattacharya, Sudin et al. (2013): Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol* 87 (8), 1315–1530.
- Gonzalez, F. J.; Lee, Y. H. (1996): Constitutive expression of hepatic cytochrome P450 genes. *FASEB J* 10 (10), 1112–1117.
- Gray, J. D.; Renton, K. W.; Hung, O. R. (1983): Depression of theophylline elimination following BCG vaccination. *Br J Clin Pharmacol* 16 (6), 735–737.
- Gregory, Richard I.; Yan, Kai-Ping; Amuthan, Govindasamy; Chendrimada, Thimmaiah; Doratotaj, Behzad; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2004): The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432 (7014), 235–240.
- Gregory, Richard I.; Chendrimada, Thimmaiah P.; Cooch, Neil; Shiekhattar, Ramin (2005): Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123 (4), 631–640.
- Griffiths-Jones, Sam (2004): The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32 (suppl 1), D109–D111.
- Gripon, Philippe; Rumin, Sylvie; Urban, Stephan; Le Seyec, Jacques; Glaise, Denise; Cannie, Isabelle et al. (2002): Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (24), 15655–15660.

- Gruys, E.; Toussaint, M.J.M.; Niewold, T. A.; Koopmans, S. J. (2005): Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* 6 (11), 1045–1056.
- Guengerich, Peter F. (2012): Cytochromes P450. In: Pavel Anzenbacher und Ulrich M. Zanger (Hg.): *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 27–66.
- Guenther, M. G.; Barak, O.; Lazar, M. A. (2001): The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. *Mol Cell Biol* 21 (18), 6091–6101.
- Guguen-Guillouzo, Christiane; Guillouzo, Andre (2010): General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* 640, 1–40.
- Guillouzo, André; Corlu, Anne; Aninat, Caroline; Glaise, Denise; Morel, Fabrice; Guguen-Guillouzo, Christiane (2007): The human hepatoma HepaRG cells. A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 168 (1), 66–73.
- Guo, Huili; Ingolia, Nicholas T.; Weissman, Jonathan S.; Bartel, David P. (2010): Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466 (7308), 835–840.
- Gu, Xincheng; Ke, Sui; Liu, Duan; Sheng, Tao; Thomas, Paul E.; Rabson, Arnold B. et al. (2006): Role of NF- $\kappa$ B in Regulation of PXR-mediated Gene Expression A MECHANISM FOR THE SUPPRESSION OF CYTOCHROME P-450 3A4 BY PROINFLAMMATORY AGENTS. *J Biol Chem* 281 (26), 17882–17889.
- Haenisch, Sierk; Laechelt, Sandra; Bruckmueller, Henrike; Werk, Anneke; Noack, Andreas; Bruhn, Oliver et al. (2011): Down-regulation of ATP-binding cassette C2 protein expression in HepG2 cells after rifampicin treatment is mediated by microRNA-379. *Mol Pharmacol* 80 (2), 314–320.
- Halladay, Jason S.; Wong, Susan; Khojasteh, S. Cyrus; Grepper, Susan (2012): An 'all-inclusive' 96-well cytochrome P450 induction method. Measuring enzyme activity, mRNA levels, protein levels, and cytotoxicity from one well using cryopreserved human hepatocytes. *J Pharmacol Toxicol Methods* 66 (3), 270–275.
- Ha, Minju; Kim, V. Narry (2014): Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (8), 509–524.
- Hand, Nicholas J.; Master, Zankhana R.; Le Lay, John; Friedman, Joshua R. (2009): Hepatic function is preserved in the absence of mature microRNAs. *Hepatology* 49 (2), 618–626.
- Hannun, Y. A.; Bell, R. M. (1988): Aminoacridines, potent inhibitors of protein kinase C. *J Biol Chem* 263 (11), 5124–5131.
- Hatzia Apostolou, Maria; Polytaichou, Christos; Aggelidou, Eleni; Drakaki, Alexandra; Poultsides, George A.; Jaeger, Savina A. et al. (2011): An HNF4 $\alpha$ -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell* 147 (6), 1233–1247.
- Hayes, C. Nelson; Chayama, Kazuaki (2016): MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci* 17 (3), 280.
- Heinrich, P. C.; Castell, J. V.; Andus, T. (1990): Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265 (3), 621–636.
- Hermeking, H. (2010): The *miR-34* family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17 (2), 193.
- Hiard, Samuel; Charlier, Carole; Coppieters, Wouter; Georges, Michel; Baurain, Denis (2010): Patrocles. A database of polymorphic miRNA-mediated gene regulation in vertebrates. *Nucleic Acids Res* 38 (Database issue), D640-51.
- Hinske, Ludwig Christian G.; Galante, Pedro A. F.; Kuo, Winston P.; Ohno-Machado, Lucila (2010): A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. *BMC Genomics* 11, 533.

- Hoffmann, Thomas Walter; Duverlie, Gilles; Gilles, Duverlie; Bengrine, Abderrahmane; Abderrahmane, Bengrine (2012): MicroRNAs and hepatitis C virus. Toward the end of miR-122 supremacy. *Virology* 9, 109.
- Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'--3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (16), 7276–7280.
- Honkakoski, P.; Negishi, M. (2000): Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem J* 347 (Pt 2), 321–337.
- Hörlein, A. J.; Näär, A. M.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Gloss, B.; Kurokawa, R. et al. (1995): Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377 (6548), 397–404.
- Hua, Zhong; Lv, Qing; Ye, Wenbin; Wong, Chung-Kwun Amy; Cai, Guoping; Gu, Dayong et al. (2006): MiRNA-Directed Regulation of VEGF and Other Angiogenic Factors under Hypoxia. *PLoS ONE* 1 (1), e1116.
- Hu, Gang; Xu, Chenshu; Staudinger, Jeff L. (2010): Pregnane X Receptor Is SUMOylated to Repress the Inflammatory Response. *J Pharmacol Exp Ther* 335 (2), 342–350.
- Ibáñez-Ventoso, Carolina; Vora, Mehul; Driscoll, Monica (2008): Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS ONE* 3 (7), e2818.
- Iber, H.; Chen, Q.; Cheng, P. Y.; Morgan, E. T. (2000): Suppression of CYP2C11 gene transcription by interleukin-1 mediated by NF-kappaB binding at the transcription start site. *Arch Biochem Biophys* 377 (1), 187–194.
- Iftikhar, Hina; Carney, Ginger E. (2016): Evidence and potential in vivo functions for biofluid miRNAs. From expression profiling to functional testing: Potential roles of extracellular miRNAs as indicators of physiological change and as agents of intercellular information exchange. *Bioessays* 38 (4), 367–378.
- Ismail, Noura; Wang, Yijie; Dakhllallah, Duaa; Moldovan, Leni; Agarwal, Kitty; Batte, Kara et al. (2013): Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 121 (6), 984–995.
- Jackson, Jonathan P.; Li, Linhou; Chamberlain, Erica D.; Wang, Hongbing; Ferguson, Stephen S. (2016): Contextualizing Hepatocyte Functionality of Cryopreserved HepaRG Cell Cultures. *Drug Metab Dispos* 44 (9), 1463–1479.
- Ji, Jia; Chen, Hao; Liu, Xiao-Ping; Wang, Yu-Hui; Luo, Chang-Liang; Zhang, Wu-Wen et al. (2018): A miRNA Combination as Promising Biomarker for Hepatocellular Carcinoma Diagnosis. A Study Based on Bioinformatics Analysis. *J Cancer* 9 (19), 3435–3446.
- Jopling, Catherine L.; Yi, Minkyung; Lancaster, Alissa M.; Lemon, Stanley M.; Sarnow, Peter (2005): Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* 309 (5740), 1577–1581.
- Jouan, Elodie; Le Vée, Marc; Denizot, Claire; Parmentier, Yannick; Fardel, Olivier (2016): Drug Transporter Expression and Activity in Human Hepatoma HuH-7 Cells. *Pharmaceutics* 9 (1), 3.
- Jover, Ramiro; Bort, Roque; Gómez-Lechón, M. José; Castell, José V. (2002): Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6. Molecular mechanism and transcription factors involved. *FASEB J* 16 (13), 1799–1801.
- Jover, Ramiro; Moya, Marta; Gomez-Lechon, M. (2009): Transcriptional Regulation of Cytochrome P450 Genes by the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4-Alpha. *Curr Drug Metab* 10 (5), 508–519.



- Kandel, Benjamin A.; Thomas, Maria; Winter, Stefan; Damm, Georg; Seehofer, Daniel; Burk, Oliver et al. (2016): Genomewide comparison of the inducible transcriptomes of nuclear receptors CAR, PXR and PPAR $\alpha$  in primary human hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1859 (9), 1218–1227.
- Kanebratt, Kajsa P.; Andersson, Tommy B. (2008): Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos* 36 (7), 1444–1452.
- Keller, Roland; Klein, Marcus; Thomas, Maria; Dräger, Andreas; Metzger, Ute; Templin, Markus F. et al. (2016): Coordinating Role of RXR $\alpha$  in Downregulating Hepatic Detoxification during Inflammation Revealed by Fuzzy-Logic Modeling. *PLOS Comput Biol* 12 (1), e1004431.
- Kennedy, Edward M.; Bassit, Leda C.; Mueller, Henrik; Kornepati, Anand V. R.; Bogerd, Hal P.; Nie, Ting et al. (2015): Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* 476, 196–205.
- Kenny, Jane R.; Liu, Maggie M.; Chow, Andrew T.; Earp, Justin C.; Evers, Raymond; Slatter, J. Greg et al. (2013): Therapeutic protein drug-drug interactions. Navigating the knowledge gaps-highlights from the 2012 AAPS NBC Roundtable and IQ Consortium/FDA workshop. *AAPS J* 15 (4), 933–940.
- Khatsenko, O. G.; Gross, S. S.; Rifkind, A. B.; Vane, J. R. (1993): Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90 (23), 11147–11151.
- Khvorova, Anastasia; Reynolds, Angela; Jayasena, Sumedha D. (2003): Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* 115 (2), 209–216.
- Kida, Katsuhiko; Nakajima, Miki; Mohri, Takuya; Oda, Yuki; Takagi, Shingo; Fukami, Tatsuki; Yokoi, Tsuyoshi (2011): PPAR $\alpha$  is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharm Res* 28 (10), 2467–2476.
- Kikuchi, Ryota; Kusuhara, Hiroyuki; Hattori, Naka; Shiota, Kunio; Kim, Insook; Gonzalez, Frank J.; Sugiyama, Yuichi (2006): Regulation of the expression of human organic anion transporter 3 by hepatocyte nuclear factor 1 $\alpha$ /beta and DNA methylation. *Mol Pharmacol* 70 (3), 887–896.
- Kim, Joo-Young; Lee, Sun-Mee (2006): Vitamins C and E protect hepatic cytochrome P450 dysfunction induced by polymicrobial sepsis. *Eur J Pharmacol* 534 (1-3), 202–209.
- Kim, Min Sun; Sweeney, Trevor R.; Shigenaga, Judy K.; Chui, Lisa G.; Moser, Arthur; Grunfeld, Carl; Feingold, Kenneth R. (2007): Tumor necrosis factor and interleukin 1 decrease RXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , and the coactivators SRC-1, PGC-1 $\alpha$ , and PGC-1 $\beta$  in liver cells. *Metabolism* 56 (2), 267–279.
- Kim, S. G.; Cho, J. Y.; Chung, Y. S.; Ahn, E. T.; Lee, K. Y.; Han, Y. B. (1998): Suppression of xenobiotic-metabolizing enzyme expression in rats by acriflavine, a protein kinase C inhibitor. Effects on epoxide hydrolase, glutathione S-transferases, and cytochromes p450. *Drug Metab Dispos* 26 (1), 66–72.
- Klein, Kathrin; Winter, Stefan; Turpeinen, Miia; Schwab, Matthias; Zanger, Ulrich M. (2010): Pathway-targeted pharmacogenomics of CYP1A2 in human liver. *Front Pharmacol* 1, 129.
- Klein, Marcus; Thomas, Maria; Hofmann, Ute; Seehofer, Daniel; Damm, Georg; Zanger, Ulrich M. (2015): A systematic comparison of the impact of inflammatory signaling on absorption, distribution, metabolism, and excretion gene expression and activity in primary human hepatocytes and HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 43 (2), 273–283.

- Kloosterman, Wigard P.; Plasterk, Ronald H. A. (2006): The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease. *Dev Cell* 11 (4), 441–450.
- Knowles, B. B.; Howe, C. C.; Aden, D. P. (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209 (4455), 497–499.
- Koike, Chika; Moore, Rick; Negishi, Masahiko (2007): Extracellular signal-regulated kinase is an endogenous signal retaining the nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR) in the cytoplasm of mouse primary hepatocytes. *Mol Pharmacol* 71 (5), 1217–1221.
- Kozomara, Ana; Birgaoanu, Maria; Griffiths-Jones, Sam (2019): miRBase. From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 47 (D1), D155-D162.
- Kraemer, Michael J.; Furukawa, Clifton T.; Koup, Jeffrey R.; Shapiro, Gail G.; Pierson, William E.; Bierman, C. Warren (1982): Altered Theophylline Clearance During an Influenza B Outbreak. *Pediatrics* 69 (4), 476–480.
- Krol, Jacek; Sobczak, Krzysztof; Wilczynska, Urszula; Drath, Maria; Jasinska, Anna; Kaczynska, Danuta; Krzyzosiak, Włodzimierz J. (2004): Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem* 279 (40), 42230–42239.
- Krol, Jacek; Loedige, Inga; Filipowicz, Witold (2010): The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11 (9), 597–610.
- Kuepfer, L.; Kerb, R.; Henney, A. M. (2014): Clinical translation in the virtual liver network. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 3, e127.
- Kugler, Nicole; Klein, Kathrin; Zanger, Ulrich M. (2019): MiR-155 and other microRNAs downregulate drug metabolizing cytochromes P450 in inflammation. *Biochem Pharmacol*, DOI: 10.1016/j.bcp.2019.113725.
- Lagos-Quintana, M.; Rauhut, R.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294 (5543), 853–858.
- Lagos-Quintana, Mariana; Rauhut, Reinhard; Yalcin, Abdullah; Meyer, Jutta; Lendeckel, Winfried; Tuschl, Thomas (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12 (9), 735–739.
- Laurent, Veronique; Fraix, Aurore; Montier, Tristan; Cammas-Marion, Sandrine; Ribault, Catherine; Benvegna, Thierry et al. (2010): Highly efficient gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells. New means for drug metabolism and toxicity studies. *Biotechnol J* 5 (3), 314–320.
- Laurent, Véronique; Glaise, Denise; Nübel, Tobias; Gilot, David; Corlu, Anne; Loyer, Pascal (2013): Highly efficient siRNA and gene transfer into hepatocyte-like HepaRG cells and primary human hepatocytes. New means for drug metabolism and toxicity studies. *Methods Mol Biol* 987, 295–314.
- Lauschke, Volker M.; Vorrink, Sabine U.; Moro, Sabrina M. L.; Rezayee, Fatemah; Nordling, Åsa; Hendriks, Delilah F. G. et al. (2016): Massive rearrangements of cellular MicroRNA signatures are key drivers of hepatocyte dedifferentiation. *Hepatology* 64 (5), 1743–1756.
- Lauschke, Volker M.; Mkrtchian, Souren; Ingelman-Sundberg, Magnus (2017): The role of microRNAs in liver injury at the crossroad between hepatic cell death and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 482 (3), 399–407.
- Lauschke, Volker M.; Shafagh, Reza Z.; Hendriks, Delilah F. G.; Ingelman-Sundberg, Magnus (2019): 3D Primary Hepatocyte Culture Systems for Analyses of Liver Diseases, Drug

- Metabolism, and Toxicity. Emerging Culture Paradigms and Applications. *Biotechnol J* 14 (7), e1800347.
- Le Vee, Marc; Noel, Gregory; Jouan, Elodie; Stieger, Bruno; Fardel, Olivier (2013): Polarized expression of drug transporters in differentiated human hepatoma HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* 27 (6), 1979–1986.
- LeCluyse, E. L. (2001): Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 13 (4), 343–368.
- LeCluyse, Edward L.; Alexandre, Eliane; Hamilton, Geraldine A.; Viollon-Abadie, Catherine; Coon, D. James; Jolley, Summer; Richert, Lysiane (2005): Isolation and culture of primary human hepatocytes. *Methods Mol Biol* 290, 207–229.
- LeCluyse, Edward L.; Alexandre, Eliane (2010): Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. *Methods Mol Biol* 640, 57–82.
- Lee, B. L.; Wong, D.; Benowitz, N. L.; Sullam, P. M. (1993a): Altered patterns of drug metabolism in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Pharmacol Ther* 53 (5), 529–535.
- Lee, H. Y.; Suh, Y. A.; Robinson, M. J.; Clifford, J. L.; Hong, W. K.; Woodgett, J. R. et al. (2000): Stress pathway activation induces phosphorylation of retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275 (41), 32193–32199.
- Lee, Hosuk; Han, Sungwook; Kwon, Chang Seob; Lee, Daeyoup (2016): Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* 7 (2), 100–113.
- Lee, KangAe; Zhang, Huafeng; Qian, David Z.; Rey, Sergio; Liu, Jun O.; Semenza, Gregg L. (2009): Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (42), 17910–17915.
- Lee, R. C.; Feinbaum, R. L.; Ambros, V. (1993b): The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5), 843–854.
- Lee, Yoontae; Ahn, Chiyoung; Han, Jinju; Choi, Hyounjeong; Kim, Jaekwang; Yim, Jeongbin et al. (2003): The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425 (6956), 415–419.
- Lee, Yoontae; Kim, Minju; Han, Jinju; Yeom, Kyu-Hyun; Lee, Sanghyuk; Baek, Sung Hee; Kim, V. Narry (2004): MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23 (20), 4051–4060.
- Lewis, Benjamin P.; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1), 15–20.
- Li, A. P.; Gorycki, P. D.; Hengstler, J. G.; Kedderis, G. L.; Koebe, H. G.; Rahmani, R. et al. (1999): Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics. Consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact* 121 (1), 117–123.
- Li, Albert P. (2015): Evaluation of Adverse Drug Properties with Cryopreserved Human Hepatocytes and the Integrated Discrete Multiple Organ Co-culture (IdMOC™) System. *Toxicol Res* 31 (2), 137–149.
- Lichti-Kaiser, Kristin; Xu, Chenshu; Staudinger, Jeff L. (2009): Cyclic AMP-dependent protein kinase signaling modulates pregnane x receptor activity in a species-specific manner. *J Biol Chem* 284 (11), 6639–6649.

- Li, Duo; Zimmerman, Tracy L.; Thevananther, Sundararajah; Lee, Ho-Young; Kurie, Jonathan M.; Karpen, Saul J. (2002): Interleukin-1 beta-mediated suppression of RXR:RAR transactivation of the Ntcp promoter is JNK-dependent. *J Biol Chem* 277 (35), 31416–31422.
- Li, Jing-Jing; Huang, Min-Jun; Li, Zhen; Li, Wei; Wang, Fei; Wang, Lei et al. (2018): Identification of potential whole blood MicroRNA biomarkers for the blood stage of adult imported falciparum malaria through integrated mRNA and miRNA expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun* 506 (3), 471–477.
- Lin, B.; Feng, D-G; Wang, F.; Wang, J-X; Xu, C-G; Zhao, H.; Cheng, Z-Y (2016): MiR-365 participates in coronary atherosclerosis through regulating IL-6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20 (24), 5186–5192.
- Lin, Xiaolin; Jia, Junshuang; Du, Tao; Li, Wei; Wang, Xiaoyan; Wei, Jieqiong et al. (2015): Overexpression of miR-155 in the liver of transgenic mice alters the expression profiling of hepatic genes associated with lipid metabolism. *PLoS ONE* 10 (3), e0118417.
- Liu, Jidong; Carmell, Michelle A.; Rivas, Fabiola V.; Marsden, Carolyn G.; Thomson, J. Michael; Song, Ji-Joon et al. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305 (5689), 1437–1441.
- Liu, Ju-E.; Ren, Bin; Tang, Lan; Tang, Qian-Jie; Liu, Xiao-Ying; Li, Xin et al. (2016): The independent contribution of miRNAs to the missing heritability in CYP3A4/5 functionality and the metabolism of atorvastatin. *Sci Rep* 6, 26544.
- Liu, Weijun; Wang, Xiaowei (2019): Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol* 20 (1), 18.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 25 (4), 402–408.
- López-Terrada, Dolores; Cheung, Sau Wai; Finegold, Milton J.; Knowles, Barbara B. (2009): Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum Pathol* 40 (10), 1512–1515.
- Luckert, Claudia; Schulz, Christina; Lehmann, Nadja; Thomas, Maria; Hofmann, Ute; Hammad, Seddik et al. (2017): Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. *Arch Toxicol* 91 (1), 393–406.
- Lukowski, Samuel W.; Fish, Richard J.; Martin-Levilain, Juliette; Gonelle-Gispert, Carmen; Bühler, Leo H.; Maechler, Pierre et al. (2015): Integrated analysis of mRNA and miRNA expression in response to interleukin-6 in hepatocytes. *Genomics* 106 (2), 107–115.
- Lund, Elsebet; Güttinger, Stephan; Calado, Angelo; Dahlberg, James E.; Kutay, Ulrike (2004): Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303 (5654), 95–98.
- Macek, Boris; Mann, Matthias; Olsen, Jesper V. (2009): Global and site-specific quantitative phosphoproteomics. Principles and applications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 199–221.
- Mackenzie, N. C. W.; Staines, K. A.; Zhu, D.; Genever, P.; Macrae, V. E. (2014): miRNA-221 and miRNA-222 synergistically function to promote vascular calcification. *Cell Biochem Funct* 32 (2), 209–216.
- Macoritto, Michael; Nguyen-Yamamoto, Loan; Huang, Dao Chao; Samuel, Sara; Yang, Xian Fang; Wang, Tian Tian et al. (2008): Phosphorylation of the human retinoid X receptor alpha at serine 260 impairs coactivator(s) recruitment and induces hormone resistance to multiple ligands. *J Biol Chem* 283 (8), 4943–4956.
- Mahesh, Guruswamy; Biswas, Roopa (2019): MicroRNA-155. A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 39 (6), 321–330.

- Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. (1995): The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83 (6), 841–850.
- Mann, Matthias; Ong, Shao En; Grønborg, Mads; Steen, Hanno; Jensen, Ole N.; Pandey, Akhilesh (2002): Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry. Deciphering the phosphoproteome. *Trends Biotechnol* 20 (6), 261–268.
- Marin, Jose J. G.; Bujanda, Luis; Banales, Jesus M. (2014): MicroRNAs and cholestatic liver diseases. *Curr Opin Gastroenterol* 30 (3), 303–309.
- Marques-Rocha, José Luiz; Samblas, Mirian; Milagro, Fermin I.; Bressan, Josefina; Martínez, J. Alfredo; Marti, Amelia (2015): Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *FASEB J* 29 (9), 3595–3611.
- Marx, Uwe; Walles, Heike; Hoffmann, Silke; Lindner, Gerd; Horland, Reyk; Sonntag, Frank et al. (2012): 'Human-on-a-chip' developments. A translational cutting-edge alternative to systemic safety assessment and efficiency evaluation of substances in laboratory animals and man? *Altern Lab Anim* 40 (5), 235–257.
- Maschmeyer, Ilka; Lorenz, Alexandra K.; Schimek, Katharina; Hasenberg, Tobias; Ramme, Anja P.; Hübner, Juliane et al. (2015): A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents. *Lab Chip* 15 (12), 2688–2699.
- McCall, Charles E.; Gazzar, Mohamed El; Liu, Tiefu; Vachharajani, Vidula; Yoza, Barbara (2011): Epigenetics, bioenergetics, and microRNA coordinate gene-specific reprogramming during acute systemic inflammation. *J Leukoc Biol* 90 (3), 439–446.
- Medzhitov, Ruslan (2010): Inflammation 2010. New adventures of an old flame. *Cell* 140 (6), 771–776.
- Mi, Shuangli; Zhang, Jian; Zhang, Wei; Huang, R. Stephanie (2013): Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases. *Microna* 2 (1), 63–71.
- Mitchell, Patrick S.; Parkin, Rachael K.; Kroh, Evan M.; Fritz, Brian R.; Wyman, Stacia K.; Pogosova-Agadjanyan, Era L. et al. (2008): Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105 (30), 10513–10518.
- Mohri, Takuya; Nakajima, Miki; Fukami, Tatsuki; Takamiya, Masataka; Aoki, Yasuhiro; Yokoi, Tsuyoshi (2010): Human CYP2E1 is regulated by miR-378. *Biochem Pharmacol* 79 (7), 1045–1052.
- Moore, John T.; Collins, Jon L.; Pearce, Kenneth H. (2006): The nuclear receptor superfamily and drug discovery. *ChemMedChem* 1 (5), 504–523.
- Morgan, E. T. (1989): Suppression of constitutive cytochrome P-450 gene expression in livers of rats undergoing an acute phase response to endotoxin. *Mol Pharmacol* 36 (5), 699–707.
- Morgan, E. T. (1997): Regulation of cytochromes P450 during inflammation and infection. *Drug Metab Rev* 29 (4), 1129–1188.
- Morgan, E. T. (2001): Regulation of cytochrome p450 by inflammatory mediators. Why and how? *Drug Metab Dispos* 29 (3), 207–212.
- Morgan, E. T. (2009): Impact of infectious and inflammatory disease on cytochrome P450-mediated drug metabolism and pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 85 (4), 434–438.
- Morgan, Edward T.; Li-Masters, Tong; Cheng, Po-Yung (2002): Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology* 181-182, 207–210.
- Morgan, Edward T.; Goralski, Kerry B.; Piquette-Miller, Micheline; Renton, Kenneth W.; Robertson, Graham R.; Chaluvadi, Madhusudana R. et al. (2008): Regulation of Drug-

- Metabolizing Enzymes and Transporters in Infection, Inflammation, and Cancer. *Drug Metab Dispos* 36 (2), 205–216.
- Moschos, Sterghios A.; Williams, Andrew E.; Perry, Mark M.; Birrell, Mark A.; Belvisi, Maria G.; Lindsay, Mark A. (2007): Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC Genomics* 8, 240.
- Nakabayashi, H.; Taketa, K.; Miyano, K.; Yamane, T.; Sato, J. (1982): Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* 42 (9), 3858–3863.
- Nakajima, Miki; Yokoi, Tsuyoshi (2011): MicroRNAs from biology to future pharmacotherapy. Regulation of cytochrome P450s and nuclear receptors. *Pharmacol Ther* 131 (3), 330–337.
- Nakano, Masataka; Mohri, Takuya; Fukami, Tatsuki; Takamiya, Masataka; Aoki, Yasuhiro; McLeod, Howard L.; Nakajima, Miki (2015): Single-Nucleotide Polymorphisms in Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) 3'-Untranslated Region Affect the Regulation of CYP2E1 by miR-570. *Drug Metab Dispos* 43 (10), 1450–1457.
- Nakano, Masataka; Nakajima, Miki (2018): Current knowledge of microRNA-mediated regulation of drug metabolism in humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 14 (5), 493–504.
- Nelson, David R.; Zeldin, Darryl C.; Hoffman, Susan M. G.; Maltais, Lois J.; Wain, Hester M.; Nebert, Daniel W. (2004): Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* 14 (1), 1–18.
- Nguyen, Theresa V.; Ukairo, Okechukwu; Khetani, Salman R.; McVay, Michael; Kanchagar, Chitra; Seghezzi, Wolfgang et al. (2015): Establishment of a hepatocyte-kupffer cell coculture model for assessment of proinflammatory cytokine effects on metabolizing enzymes and drug transporters. *Drug Metab Dispos* 43 (5), 774–785.
- Nies, Anne T.; Koepsell, Hermann; Winter, Stefan; Burk, Oliver; Klein, Kathrin; Kerb, Reinhold et al. (2009): Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology* 50 (4), 1227–1240.
- Nies, Anne T.; Magdy, Tarek; Schwab, Matthias; Zanger, Ulrich M. (2015): Role of ABC transporters in fluoropyrimidine-based chemotherapy response. *Adv Cancer Res* 125, 217–243.
- Ning, Rui; Zhan, Yunran; He, Shuangcheng; Hu, Jinhua; Zhu, Zhu; Hu, Gang et al. (2017): Interleukin-6 Induces DEC1, Promotes DEC1 Interaction with RXR $\alpha$  and Suppresses the Expression of PXR, CAR and Their Target Genes. *Front Pharmacol* 8, 866.
- O'Brien, Jacob; Hayder, Heyam; Zayed, Yara; Peng, Chun (2018): Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 9, 402.
- O'Connell, Ryan M. (2012): MicroRNAs function on a new level. *Blood* 119 (17), 3875–3876.
- Oda, Yuki; Nakajima, Miki; Tsuneyama, Koichi; Takamiya, Masataka; Aoki, Yasuhiro; Fukami, Tatsuki; Yokoi, Tsuyoshi (2014): Retinoid X receptor  $\alpha$  in human liver is regulated by miR-34a. *Biochem Pharmacol* 90 (2), 179–187.
- Ohkura, Takako; Ohta, Kunihiro; Nagao, Takuya; Kusumoto, Kumiko; Koeda, Akiko; Ueda, Tadayoshi et al. (2014): Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism. *Drug Metab Pharmacokinet* 29 (5), 373–378.
- Oladimeji, Peter O.; Chen, Taosheng (2018): PXR. More Than Just a Master Xenobiotic Receptor. *Mol Pharmacol* 93 (2), 119–127.

- Olena, Abigail F.; Patton, James G. (2010): Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 222 (3), 540–545.
- Omura, T.; Sato, R. (1963): Fractional solubilization of haemoproteins and partial purification of carbon monoxide-binding cytochrome from liver microsomes. *Biochim Biophys Acta* 71, 224–226.
- Oñate, S. A.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J.; O'Malley, B. W. (1995): Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270 (5240), 1354–1357.
- O'Neill, Luke A.; Sheedy, Frederick J.; McCoy, Claire E. (2011): MicroRNAs. The fine-tuners of Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 11 (3), 163–175.
- Ourlin, J. C.; Vilarem, M. J.; Daujat, M.; Harricane, M. C.; Domergue, J.; Joyeux, H. et al. (1997): Lipid-mediated transfection of normal adult human hepatocytes in primary culture. *Anal Biochem* 247 (1), 34–44.
- Papageorgiou, Ioannis; Court, Michael H. (2017): Identification and validation of microRNAs directly regulating the UDP-glucuronosyltransferase 1A subfamily enzymes by a functional genomics approach. *Biochem Pharmacol* 137, 93–106.
- Parkinson, Andrew; Kazmi, Faraz; Buckley, David B.; Yerino, Phyllis; Ogilvie, Brian W.; Paris, Brandy L. (2010): System-dependent outcomes during the evaluation of drug candidates as inhibitors of cytochrome P450 (CYP) and uridine diphosphate glucuronosyltransferase (UGT) enzymes. Human hepatocytes versus liver microsomes versus recombinant enzymes. *Drug Metab Pharmacokinet* 25 (1), 16–27.
- Pascale, Clara de; Domenicotti, Cinzia; Nitti, Mariapaola; Marengo, Barbara; Catalano, Mariafrancesca; Scanarotti, Chiara et al. (2009): Modulation of CYP1A1 by PKC Inhibitors and TPA Pre-Treatments in MH1C1 Rat Hepatoma Cells Exposed to 3 -Methylcholanthrene. *TOTOXIJ* 3 (1), 47–57.
- Pascussi, J. M.; Gerbal-Chaloin, S.; Pichard-Garcia, L.; Daujat, M.; Fabre, J. M.; Maurel, P.; Vilarem, M. J. (2000): Interleukin-6 negatively regulates the expression of pregnane X receptor and constitutively activated receptor in primary human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 274 (3), 707–713.
- Pasquinelli, A. E.; Reinhart, B. J.; Slack, F.; Martindale, M. Q.; Kuroda, M. I.; Maller, B. et al. (2000): Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408 (6808), 86–89.
- Paul, Prosenjit; Chakraborty, Anindya; Sarkar, Debasree; Langthasa, Malobika; Rahman, Musfha; Bari, Minakshi et al. (2018): Interplay between miRNAs and human diseases. *J Cell Physiol* 233 (3), 2007–2018.
- Pavek, Petr (2016): Pregnane X Receptor (PXR)-Mediated Gene Repression and Cross-Talk of PXR with Other Nuclear Receptors via Coactivator Interactions. *Front Pharmacol* 7, 456.
- Pelkonen, Olavi; Turpeinen, Miia; Hakkola, Jukka; Honkakoski, Paavo; Hukkanen, Janne; Raunio, Hannu (2008): Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes. Current status. *Arch Toxicol* 82 (10), 667–715.
- Peng, Lai; Zhong, Xiaobo (2015): Epigenetic regulation of drug metabolism and transport. *Acta Pharm Sin B* 5 (2), 106–112.
- Peng, Wei; Zhao, Ning; Liu, Qin; Nie, Cheng; Qing, Cheng; Shao, Qiang et al. (2018): MicroRNA-155 reduces inflammatory response induced by lipopolysaccharide in alveolar macrophages. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 30 (11), 1061–1065.
- Pepys, Mark B.; Hirschfield, Gideon M. (2003): C-reactive protein. A critical update. *J Clin Invest* 111 (12), 1805–1812.

Pisarello, Maria Jose Lorenzo; Loarca, Lorena; Ivanics, Tommy; Morton, Leslie; LaRusso, Nicholas (2015): MicroRNAs in the Cholangiopathies. Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *J Clin Med* 4 (9), 1688–1712.

Plaisier, Christopher L.; Pan, Min; Baliga, Nitin S. (2012): A miRNA-regulatory network explains how dysregulated miRNAs perturb oncogenic processes across diverse cancers. *Genome Res* 22 (11), 2302–2314.

Pless, Gesine; Sauer, Igor M.; Rauen, Ursula (2012): Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant* 21 (1), 23–37.

Pondugula, Satyanarayana R.; Dong, Hanqing; Chen, Taosheng (2009): Phosphorylation and protein-protein interactions in PXR-mediated CYP3A repression. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5 (8), 861–873.

Privalsky, Martin L. (2004): The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66, 315–360.

Pua, Heather H.; Ansel, K. Mark (2015): MicroRNA regulation of allergic inflammation and asthma. *Curr Opin Immunol* 36, 101–108.

Rehwinkel, Jan; Behm-Ansmant, Isabelle; Gatfield, David; Izaurrealde, Elisa (2005): A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 11 (11), 1640–1647.

Reinhart, B. J.; Slack, F. J.; Basson, M.; Pasquinelli, A. E.; Bettinger, J. C.; Rougvie, A. E. et al. (2000): The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403 (6772), 901–906.

Renton, K. W.; Gray, J. D.; Hall, R. I. (1980): Decreased elimination of theophylline after influenza vaccination. *Can Med Assoc J* 123 (4), 288–290.

Renton, Kenneth W. (2004): Cytochrome P450 regulation and drug biotransformation during inflammation and infection. *Curr Drug Metab* 5 (3), 235–243.

Renton, Kenneth W. (2005): Regulation of drug metabolism and disposition during inflammation and infection. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 1 (4), 629–640.

Richardson, Terrilyn A.; Morgan, Edward T. (2005): Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* 314 (2), 703–709.

Rieger, Jessica K.; Klein, Kathrin; Winter, Stefan; Zanger, Ulrich M. (2013): Expression variability of absorption, distribution, metabolism, excretion-related microRNAs in human liver. Influence of nongenetic factors and association with gene expression. *Drug Metab Dispos* 41 (10), 1752–1762.

Rieger, Jessica K.; Reutter, Sandra; Hofmann, Ute; Schwab, Matthias; Zanger, Ulrich M. (2015): Inflammation-Associated MicroRNA-130b Down-Regulates Cytochrome P450 Activities and Directly Targets CYP2C9. *Drug Metab Dispos* 43 (6), 884–888.

Roderburg, Christoph; Benz, Fabian; Vargas Cardenas, David; Koch, Alexander; Janssen, Joern; Vucur, Mihael et al. (2015): Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver Int* 35 (4), 1172–1184.

Rodriguez, Antony; Griffiths-Jones, Sam; Ashurst, Jennifer L.; Bradley, Allan (2004): Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 14 (10A), 1902–1910.



- Rogue, Alexandra; Lambert, Carine; Spire, Catherine; Claude, Nancy; Guillouzo, André (2012): Interindividual variability in gene expression profiles in human hepatocytes and comparison with HepaRG cells. *Drug Metab Dispos* 40 (1), 151–158.
- Ro, Seungil; Park, Chanjae; Young, David; Sanders, Kenton M.; Yan, Wei (2007): Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 35 (17), 5944–5953.
- Roymans, Dirk; van Looveren, Cis; Leone, Angelique; Parker, J. Brandon; McMillian, Michael; Johnson, Mark D. et al. (2004): Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 67 (3), 427–437.
- Roy, Sashwati (2016): miRNA in Macrophage Development and Function. *Antioxid Redox Signal* 25 (15), 795–804.
- Rubin, Katarina; Janefeldt, Annika; Andersson, Linda; Berke, Zsofia; Grime, Ken; Andersson, Tommy B. (2015): HepaRG Cells as Human-Relevant In Vitro Model to Study the Effects of Inflammatory Stimuli on Cytochrome P450 Isoenzymes. *Drug Metab Dispos* 43 (1), 119–125.
- Ruby, J. Graham; Jan, Calvin H.; Bartel, David P. (2007): Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448 (7149), 83–86.
- Salmena, Leonardo; Poliseno, Laura; Tay, Yvonne; Kats, Lev; Pandolfi, Pier Paolo (2011): A ceRNA hypothesis. The Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* 146 (3), 353–358.
- Schlessinger, A.; Yee, S. W.; Sali, A.; Giacomini, K. M. (2013): SLC classification. An update. *Clin Pharmacol Ther* 94 (1), 19–23.
- Schneider Aguirre, Rebecca; Karpen, Saul J. (2013): Inflammatory mediators increase SUMOylation of retinoid X receptor  $\alpha$  in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 84 (2), 218–226.
- Schroeder, Andreas; Mueller, Odilo; Stocker, Susanne; Salowsky, Ruediger; Leiber, Michael; Gassmann, Marcus et al. (2006): The RIN. An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 7, 3.
- Schwabe, Robert F.; Seki, Ekihiro; Brenner, David A. (2006): Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 130 (6), 1886–1900.
- Scisciani, Cecilia; Vossio, Stefania; Guerrieri, Francesca; Schinzari, Valeria; Iaco, Rossana de; D'Onorio De Meo, Paolo et al. (2012): Transcriptional regulation of miR-224 upregulated in human HCCs by NF $\kappa$ B inflammatory pathways. *J Hepatol* 56 (4), 855–861.
- Sekine, Shigeki; Ogawa, Reiko; Ito, Rie; Hiraoka, Nobuyoshi; Mcmanus, Michael T.; Kanai, Yae; Hebrok, Matthias (2009): Disruption of Dicer1 Induces Dysregulated Fetal Gene Expression and Promotes Hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology* 136 (7), 2304-2315.e4.
- Seok, Junhee; Warren, H. Shaw; Cuenca, Alex G.; Mindrinos, Michael N.; Baker, Henry V.; Xu, Weihong et al. (2013): Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110 (9), 3507–3512.
- Seto, Anita G.; Beatty, Xuan; Lynch, Joshua M.; Hermreck, Melanie; Tetzlaff, Michael; Duvic, Madeleine; Jackson, Aimee L. (2018): Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, coordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol* 183 (3), 428–444.
- Sewer, Marion B.; Morgan, Edward T. (1997): Nitric oxide-independent suppression of P450 2C11 expression by interleukin-1 $\beta$  and endotoxin in primary rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 54 (6), 729–737.

- Shah, Pranav; Guo, Tao; Moore, David D.; Ghose, Romi (2014): Role of constitutive androstane receptor in Toll-like receptor-mediated regulation of gene expression of hepatic drug-metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Dispos* 42 (1), 172–181.
- Sidhu, J. S.; Omiecinski, C. J. (1995): cAMP-associated inhibition of phenobarbital-inducible cytochrome P450 gene expression in primary rat hepatocyte cultures. *J Biol Chem* 270 (21), 12762–12773.
- Siewert, Elmar; Bort, Roque; Kluge, Reinhart; Heinrich, Peter C.; Castell, José; Jover, Ramiro (2000): Hepatic Cytochrome P450 Down-regulation During Aseptic Inflammation in the Mouse Is Interleukin 6 Dependent. *Hepatology* 32 (1), 49–55.
- Singh, Avishek Kumar; Rooge, Sheetalnath Babasaheb; Varshney, Aditi; Vasudevan, Madavan; Bhardwaj, Ankit; Venugopal, Senthil Kumar et al. (2018): Global microRNA expression profiling in the liver biopsies of hepatitis B virus-infected patients suggests specific microRNA signatures for viral persistence and hepatocellular injury. *Hepatology* 67 (5), 1695–1709.
- Slaviero, Kellie A.; Clarke, Stephen J.; Rivory, Laurent P. (2003): Inflammatory response. An unrecognised source of variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of cancer chemotherapy. *Lancet Oncol* 4 (4), 224–232.
- Smutny, Tomas; Mani, Sridhar; Pavek, Petr (2013): Post-translational and post-transcriptional modifications of pregnane X receptor (PXR) in regulation of the cytochrome P450 superfamily. *Curr Drug Metab* 14 (10), 1059–1069.
- Solomon, C.; White, J. H.; Kremer, R. (1999): Mitogen-activated protein kinase inhibits 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-dependent signal transduction by phosphorylating human retinoid X receptor alpha. *J Clin Invest* 103 (12), 1729–1735.
- Song, Guisheng; Wang, Li (2008): MiR-433 and miR-127 arise from independent overlapping primary transcripts encoded by the miR-433-127 locus. *PLoS ONE* 3 (10), e3574.
- Sonkoly, Enikő; Pivarcsi, Andor (2009): microRNAs in Inflammation. *Int Rev Immunol* 28 (6), 535–561.
- Spurgeon, Sandra L.; Jones, Robert C.; Ramakrishnan, Ramesh (2008): High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. *PLoS ONE* 3 (2), e1662.
- Starkey Lewis, P. J.; Merz, M.; Couttet, P.; Grenet, O.; Dear, J.; Antoine, D. J. et al. (2012): Serum microRNA biomarkers for drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther* 92 (3), 291–293.
- Taganov, Konstantin D.; Boldin, Mark P.; Chang, Kuang-Jung; Baltimore, David (2006): NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103 (33), 12481–12486.
- Takagi, S.; Nakajima, M.; Mohri, T.; 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 (15), 9674–9680.
- Taneja, Guncha; Maity, Suman; Jiang, Weiwu; Moorthy, Bhagavatula; Coarfa, Cristian; Ghose, Romi (2019): Transcriptomic profiling identifies novel mechanisms of transcriptional regulation of the cytochrome P450 (Cyp)3a11 gene. *Sci Rep* 9 (1), 6663.
- Tang, Hui; Zhang, Jianwen; Yu, Zhenyu; Ye, Linsen; Li, Kun; Ding, Fan et al. (2017): Mir-452-3p. A Potential Tumor Promoter That Targets the CPEB3/EGFR Axis in Human Hepatocellular Carcinoma. *Technol Cancer Res Treat* 16 (6), 1136–1149.

- Tanner, Norman; Kubik, Lisa; Luckert, Claudia; Thomas, Maria; Hofmann, Ute; Zanger, Ulrich M. et al. (2018): Regulation of Drug Metabolism by the Interplay of Inflammatory Signaling, Steatosis, and Xeno-Sensing Receptors in HepaRG Cells. *Drug Metab Dispos* 46 (4), 326–335.
- Teng, Shirley; Piquette-Miller, Micheline (2005): The involvement of the pregnane X receptor in hepatic gene regulation during inflammation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 312 (2), 841–848.
- Thomas, Maria; Burk, Oliver; Klumpp, Britta; Kandel, Benjamin A.; Damm, Georg; Weiss, Thomas S. et al. (2013): Direct transcriptional regulation of human hepatic cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ). *Mol Pharmacol* 83 (3), 709–718.
- Thomas, Maria; Rieger, Jessica K.; Kandel, Benjamin A.; Klein, Kathrin; Zanger, Ulrich M. (2014): Targeting Nuclear Receptors with Lentivirus-Delivered Small RNAs in Primary Human Hepatocytes. *Cell Physiol Biochem* 33 (6), 2003–2013.
- Thomson, Daniel W.; Dinger, Marcel E. (2016): Endogenous microRNA sponges. Evidence and controversy. *Nat Rev Genet* 17 (5), 272–283.
- Tian, Qi; Sun, He-Fen; Wang, Wen-Jing; Li, Qing; Ding, Jie; Di, Wen (2019): miRNA-365b promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion by downregulating SGTB. *Future Oncol* 15 (17), 2019–2028.
- Tian, Y.; Ke, S.; Denison, M. S.; Rabson, A. B.; Gallo, M. A. (1999): Ah receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J Biol Chem* 274 (1), 510–515.
- Tili, Esmerina; Michaille, Jean-Jacques; Cimino, Amelia; Costinean, Stefan; Dumitru, Calin Dan; Adair, Brett et al. (2007): Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *J Immunol* 179 (8), 5082–5089.
- Tirona, Rommel G.; Kim, Richard B. (2005): Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci* 94 (6), 1169–1186.
- Tokar, Tomas; Pastrello, Chiara; Rossos, Andrea E. M.; Abovsky, Mark; Hauschild, Anne-Christin; Tsay, Mike et al. (2017): mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic Acids Res.*
- Tolosa, Laia; Gómez-Lechón, M. José; Jiménez, Nuria; Hervás, David; Jover, Ramiro; Donato, M. Teresa (2016): Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 302, 1–9.
- Tsuchiya, Yuki; Nakajima, Miki; Takagi, Shingo; Taniya, Takao; Yokoi, Tsuyoshi (2006): MicroRNA regulates the expression of human cytochrome P450 1B1. *Cancer Res* 66 (18), 9090–9098.
- Tüfekci, Kemal Uğur; Oner, Meryem Gülfem; Meuwissen, Ralph Leo Johan; Genç, Sermin (2014): The role of microRNAs in human diseases. *Methods Mol Biol* 1107, 33–50.
- Turpeinen, Miia; Tolonen, Ari; Chesne, Christophe; Guillouzo, André; Uusitalo, Jouko; Pelkonen, Olavi (2009): Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicol In Vitro* 23 (4), 748–753.
- van Ess, Peter J.; Mattson, Mark P.; Blouin, Robert A. (2002): Enhanced induction of cytochrome P450 enzymes and CAR binding in TNF (p55(-)/p75(-)) double receptor knockout mice following phenobarbital treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (3), 824–830.
- Vasudevan, Shobha; Tong, Yingchun; Steitz, Joan A. (2007): Switching from repression to activation. MicroRNAs can up-regulate translation. *Science* 318 (5858), 1931–1934.

- Vasudevan, Shobha (2012): Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3 (3), 311–330.
- Vondran, Florian Wolfgang Rudolf; Katzenz, Ekaterina; Schwartlander, Ruth; Morgul, Mehmet Haluk; Raschzok, Nathanael; Gong, Xiaobing et al. (2008): Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy. Criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs* 32 (3), 205–213.
- Vuppalanchi, Raj; Liang, Tiebing; Goswami, Chirayu Pankaj; Nalamasu, Rohit; Li, Lang; Jones, David et al. (2013): Relationship between differential hepatic microRNA expression and decreased hepatic cytochrome P450 3A activity in cirrhosis. *PLoS ONE* 8 (9), e74471.
- Wang, B.; Cai, S. R.; Gao, C.; Sladek, F. M.; Ponder, K. P. (2001): Lipopolysaccharide results in a marked decrease in hepatocyte nuclear factor 4 alpha in rat liver. *Hepatology* 34 (5), 979–989.
- Wang, Kai; Zhang, Shile; Marzolf, Bruz; Troisch, Pamela; Brightman, Amy; Hu, Zhiyuan et al. (2009): Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106 (11), 4402–4407.
- Wang, Yuping; Liu, Zhichao; Zou, Wen; Hong, Huixiao; Fang, Hong; Tong, Weida (2015): Molecular regulation of miRNAs and potential biomarkers in the progression of hepatic steatosis to NASH. *Biomark Med* 9 (11), 1189–1200.
- Wang, Zhongchuan; Ruan, Zhengshang; Mao, Yanfei; Dong, Wenwen; Zhang, Yunqian; Yin, Na; Jiang, Lai (2014): miR-27a is up regulated and promotes inflammatory response in sepsis. *Cell Immunol* 290 (2), 190–195.
- Wang, Zhongyan; Burke, Peter A. (2013): The role of microRNAs in hepatocyte nuclear factor-4alpha expression and transactivation. *Biochim Biophys Acta* 1829 (5), 436–442.
- Watashi, Koichi; Yeung, Man Lung; Starost, Matthew F.; Hosmane, Ramachandra S.; Jeang, Kuan-Teh (2010): Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *J Biol Chem* 285 (32), 24707–24716.
- Wightman, Bruce; Ha, Ilho; Ruvkun, Gary (1993): Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75 (5), 855–862.
- Williamson, Beth; Lorbeer, Mathias; Mitchell, Michael D.; Brayman, Timothy G.; Riley, Robert J. (2016): Evaluation of a novel PXR-knockout in HepaRG™ cells. *Pharmacol Res Perspect* 4 (5).
- Winter, Julia; Diederichs, Sven (2011): MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 676, 3–22.
- Xiao, Jim J.; Huang, Ying; Dai, Zunyan; Sadée, Wolfgang; Chen, Jiyun; Liu, Shujun et al. (2005): Chemoresistance to depsipeptide FK228 (E)-(1S,4S,10S,21R)-7-(Z)-ethylidene-4,21-diisopropyl-2-oxa-12,13-dithia-5,8,20,23-tetraazabicyclo[8,7,6-trico]-16-ene-3,6,9,22-pentanone is mediated by reversible MDR1 induction in human cancer cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 314 (1), 467–475.
- Xu, De-Xiang; Wei, Wei; Sun, Mei-Fang; Wu, Cheng-Yi; Wang, Jian-Ping; Wei, Ling-Zhen; Zhou, Cheng-Fan (2004): Kupffer cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane x receptor and its target gene CYP3a in mouse liver. *Free Radic Biol Med* 37 (1), 10–22.
- Xu, Wenlong; San Lucas, Anthony; Wang, Zixing; Liu, Yin (2014): Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC Bioinformatics* 15 Suppl 7, S4.

- Xu, Zheng; Xiao, Shao-Bo; Xu, Peng; Xie, Qian; Cao, Lu; Wang, Dang et al. (2011): miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 286 (24), 21401–21412.
- Yang, Jian; Hao, Chunshu; Yang, Dongfang; Shi, Deshi; Song, Xiulong; Luan, Xiaofei et al. (2010): Pregnane X receptor is required for interleukin-6-mediated down-regulation of cytochrome P450 3A4 in human hepatocytes. *Toxicol Lett* 197 (3), 219–226.
- Yang, Xu; Guan, Yingjie; Tian, Shaoqi; Wang, Yuanhe; Sun, Kang; Chen, Qian (2016): Mechanical and IL-1 $\beta$  Responsive miR-365 Contributes to Osteoarthritis Development by Targeting Histone Deacetylase 4. *Int J Mol Sci* 17 (4), 436.
- Yi, Rui; Qin, Yi; Macara, Ian G.; Cullen, Bryan R. (2003): Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17 (24), 3011–3016.
- Yokoyama, Yuichi; Sasaki, Yoshifumi; Terasaki, Natsuko; Kawataki, Taku; Takekawa, Koji; Iwase, Yumiko et al. (2018): Comparison of Drug Metabolism and Its Related Hepatotoxic Effects in HepaRG, Cryopreserved Human Hepatocytes, and HepG2 Cell Cultures. *Biol Pharm Bull* 41 (5), 722–732.
- Yoshimura, Kotaro; Muto, Yoshinori; Shimizu, Masahito; Matsushima-Nishiwaki, Rie; Okuno, Masataka; Takano, Yukihiko et al. (2007): Phosphorylated retinoid X receptor alpha loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor beta. *Cancer Sci* 98 (12), 1868–1874.
- Yu, Dianke; Wu, Leihong; Gill, Pritmohinder; Tolleson, William H.; Chen, Si; Sun, Jinchun et al. (2018): Multiple microRNAs function as self-protective modules in acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans. *Arch Toxicol* 92 (2), 845–858.
- Yu, Lei; Zhou, Luting; Cheng, Yu; Sun, Lei; Fan, Jian; Liang, Jinlong et al. (2014): MicroRNA-543 acts as an oncogene by targeting PAQR3 in hepatocellular carcinoma. *Am J Cancer Res* 4 (6), 897–906.
- Zamule, Stephanie M.; Strom, Stephen C.; Omiecinski, Curtis J. (2008): Preservation of Hepatic Phenotype in Lentiviral-Transduced Primary Human Hepatocytes. *Chem Biol Interact* 173 (3), 179–186.
- Zanger, Ulrich M.; Turpeinen, Miia; Klein, Kathrin; Schwab, Matthias (2008): Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem* 392 (6), 1093–1108.
- Zanger, Ulrich M.; Eichelbaum, Michel (2008): P450 Mono-oxygenase System. In: Stefan Offermanns und Walter Rosenthal (Hg.): *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 921–927.
- Zanger, Ulrich M. (2012): Introduction to Drug Metabolism. In: Pavel Anzenbacher und Ulrich M. Zanger (Hg.): *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 287–300.
- Zanger, Ulrich M.; Schwab, Matthias (2013): Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism. Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138 (1), 103–141.
- Zanger, Ulrich M. (2014): Genetic variability of CYP2D6. Basic and clinical aspects. In: Pierre Baumann (Hg.): *CYP2D6: Genetics, Pharmacology and Clinical Relevance: Future Medicine Ltd*, 28–41, zuletzt geprüft am 23.06.2014.
- Zanger, Ulrich M.; Klein, K.; Thomas, M.; Rieger, J. K.; Tremmel, R.; Kandel, B. A. et al. (2014): Genetics, epigenetics, and regulation of drug-metabolizing cytochrome p450 enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 95 (3), 258–261.

Zanger, Ulrich M.; Klein, Kathrin; Kugler, Nicole; Petrikat, Tamara; Ryu, Chang S. (2018): Epigenetics and MicroRNAs in Pharmacogenetics. In: Kim Brøsen und Per Damkier (Hg.): Pharmacogenetics. First edition. Cambridge, MA: Academic Press (Advances in pharmacology, volume 83), 33–64.

Zhang, Haidi; Kolb, Fabrice A.; Jaskiewicz, Lukasz; Westhof, Eric; Filipowicz, Witold (2004): Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118 (1), 57–68.

Zheng, De-Zhi; Bu, Yan-Min; Wang, Lei (2018): miR-130b participates in wear particle-induced inflammation and osteolysis via FOXF2/NF- $\kappa$ B pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 40 (5), 408–414.

Zhu, Hua; Wu, Hao; Liu, Xiuping; Evans, Brad R.; Medina, Daniel J.; Liu, Chang-Gong; Yang, Jin-Ming (2008): Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 76 (5), 582–588.

Zimmerman, Tracy L.; Thevananther, Sundararajah; Ghose, Romi; Burns, Alan R.; Karpen, Saul J. (2006): Nuclear export of retinoid X receptor alpha in response to interleukin-1beta-mediated cell signaling. Roles for JNK and SER260. *J Biol Chem* 281 (22), 15434–15440.

Zordoky, Beshay N. M.; El-Kadi, Ayman O. S. (2009): Role of NF-kappaB in the regulation of cytochrome P450 enzymes. *Curr Drug Metab* 10 (2), 164–178.

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Faktoren, die den Arzneistoffmetabolismus beeinflussen. ....	3
Abb. 2: Allgemeine Regulation des Arzneistoffmetabolismus.....	5
Abb. 3: MiRNA-Biogenese und Funktion. ....	17
Abb. 4: Protokoll zur Kulturvierung von HepaRG-Zellen.....	36
Abb. 5: Plasmidkarte des Dual-Luciferase miRNA-Target Expression Vektor pmirGLO.....	50
Abb. 6: Aufbau der Luciferase-Reporter-Konstrukte. ....	50
Abb. 7: Schematischer Ablauf des Luciferase-Reporter-Assays. ....	53
Abb. 8: Lumineszenzreaktionen der Firefly- und Renilla-Luciferasen.....	53
Abb. 9: Morphologie der hepatischen Zellmodelle. ....	64
Abb. 10: Absolute CYP-Enzymaktivitäten der hepatischen Zellmodelle. ....	65
Abb. 11: Zeitabhängiger Verlauf der CYP-Enzymaktivitäten in hepatischen Zellmodellen. ....	66
Abb. 12: Akut-Phase-Reaktion bei CYP-Enzymaktivitäten in hepatischen Zellmodellen. ....	67
Abb. 13: Induzierbarkeit der CYP-Enzymaktivitäten in hepatischen Zellmodellen. ....	68
Abb. 14: Akut-Phase-Reaktion und Induzierbarkeit der CYP-Genexpression in hepatischen Zellmodellen. ....	69
Abb. 15 Transfektionseffizienz in HepaRG-Zellen.....	70
Abb. 16: Transfektionseffizienz in kryokonservierten humanen Hepatozyten. ....	71
Abb. 17: Knockdown von RXR $\alpha$ in hepatischen Zellmodellen. ....	72
Abb. 18: Einfluss von Cytokinen auf CYP-Enzymaktivitäten. ....	74
Abb. 19: Einfluss von Cytokinen auf RXR $\alpha$ . ....	75
Abb. 20: Einfluss von Cytokin-Kombinationen auf RXR $\alpha$ . ....	76
Abb. 21: Einfluss von Cytokinen auf RXR $\alpha$ -Proteinmodifikationen - Glykosylierung.....	77
Abb. 22: Einfluss von Cytokinen auf RXR $\alpha$ -Proteinmodifikationen - 2D-Western Blotting. ....	78
Abb. 23: Validierung des PXR-Antikörpers in HepaRG-Zellen. ....	79
Abb. 24: Einfluss von Cytokinen auf die PXR-Proteinexpression. ....	80
Abb. 25: Validierung von <i>in silico</i> vorhergesagten miRNA-Bindestellen in ADME-Genen. ....	83
Abb. 26: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf die ADME-Genexpression durch Überexpression.85	
Abb. 27: Einfluss von miRNA-Kombinationen auf die ADME-Genexpression durch Überexpression. ....	87
Abb. 28: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf CYP-Enzymaktivitäten durch Überexpression. ..	88
Abb. 29: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf CYP-Enzymaktivitäten durch Titration. ....	89
Abb. 30: Einfluss von miRNA-Kombinationen auf CYP-Enzymaktivitäten durch Überexpression.90	
Abb. 31: Heatmap der Korrelationsanalyse zwischen miRNA-Expression und CYP/POR Phänotypen. ....	92
Abb. 32: Einfluss von Cytokinen auf die miRNA-Expression in HepaRG-Zellen. ....	94
Abb. 33: Überschneidung von differenziell exprimierten miRNAs in IL-6/IL-1 $\beta$ -behandelten HepaRG-Zellen und gepoolten Leberproben von Patienten mit erhöhtem CRP. ....	95
Abb. 34: Validierte miRNA-Bindestellen unter Cytokineinfluss in Huh7-Zellen. ....	98
Abb. 35: Validierte miRNA-Bindestellen unter Cytokineinfluss in HepG2-Zellen.....	99
Abb. 36: Einfluss von miRNA-Kandidaten auf CYP-Enzymaktivitäten durch Inhibierung.....	100
Abb. 37: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf CYP-Enzymaktivitäten (absolut). ....	102
Abb. 38: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf CYP-Enzymaktivitäten (relativ). ....	103
Abb. 39: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf die CYP2C9 Proteinexpression.....	104
Abb. 40: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf die ADME-Genexpression. ....	106
Abb. 41: Einfluss von Acriflavin auf die Zellviabilität von HepaRG-Zellen. ....	107

## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 42: Einfluss von Kombinationsbehandlungen aus Acriflavin und Cytokinen auf die Zellviabilität bei HepaRG-Zellen.....	108
Abb. 43: Einfluss von Acriflavin auf die ADME-Genexpression. ....	110
Abb. 44: Indirekter Einfluss von Acriflavin auf CYP-Enzymaktivitäten - Zeitverlauf.....	111
Abb. 45: Direkter Einfluss von Acriflavin auf CYP-Enzymaktivitäten. ....	113



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien. ....	23
Tab. 2: Puffer und Lösungen. ....	24
Tab. 3: Kits. ....	25
Tab. 4: Geräte. ....	26
Tab. 5: Verbrauchsmaterialien. ....	26
Tab. 6: TaqMan®-Assays für qRT-PCR Genexpressionsanalyse. ....	27
Tab. 7: MiRNA-Mimic/Antagomirs und siRNAs für Transfektionen. ....	28
Tab. 8: Antikörper für Western Blot. ....	29
Tab. 9: Verwendete Zellen und Zelllinien. ....	29
Tab. 10: Zusammensetzung der Zellkulturmedien. ....	30
Tab. 11: Verwendete pmirGLO Plasmidderivate für Luciferase-Reporter-Assays. ....	30
Tab. 12: Software und Datenbanken. ....	33
Tab. 13: Konzentrationen der Cytokinbehandlungen. ....	37
Tab. 14: Behandlungen und eingesetzte Konzentrationen von Acriflavin und Cytokinen. ....	38
Tab. 15: Zusammensetzung der Leberbankpools. ....	40
Tab. 16: Poly(A)-Mastermix. ....	43
Tab. 17: Hybridisierungscocktail-Mastermix. ....	43
Tab. 18: Wasch- und Färbeprotokoll für die Fluidics Station 450. ....	44
Tab. 19: Mastermix für die cDNA-Synthese. ....	45
Tab. 20: Temperaturprotokoll für die cDNA-Synthese. ....	45
Tab. 21: Reagenzien für die Präamplifizierung der cDNA. ....	46
Tab. 22: Temperaturprotokoll für die Präamplifizierung der cDNA. ....	46
Tab. 23: Mastermix für qRT-PCR auf dem 7900HT Fast Real-Time PCR System. ....	47
Tab. 24: Temperaturprotokoll für das 7900HT Fast Real-Time PCR System. ....	47
Tab. 25: Vorbereitung der TaqMan® Assays für den 48.48 Dynamic Array™ IFC. ....	48
Tab. 26: Probenvorbereitung für den 48.48 Dynamic Array™ IFC. ....	48
Tab. 27: Temperaturprotokoll für das BioMark HD system mit 48.48 Dynamic Array™ IFC (GE 48x48 Standard v1). ....	48
Tab. 28: Übersicht über die Erstellung der Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte. ....	51
Tab. 29: Berücksichtigte ADME-Gene für die Target-Vorhersagen. ....	54
Tab. 30: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele für die SDS-PAGE (1D). ....	57
Tab. 31: Protokoll für die isoelektrische Fokussierung IEF Nano GE 7 cm. ....	58
Tab. 32: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE (2D). ....	58
Tab. 33: Substrate des CYP-Cocktail-Assays bei Zellen. ....	60
Tab. 34: Stocklösungen der untersuchten Metaboliten und internen Standards zur Messung der CYP-Enzymaktivitäten. ....	61
Tab. 35: Substrate des CYP-Cocktail-Assays bei Lebermikrosomeninkubation. ....	61
Tab. 36: Herstellung des NADPH regenerierenden Systems (10X). ....	62
Tab. 37: Transfektionseffizienz in den hepatischen Zellmodellen. ....	71
Tab. 38: Untersuchte <i>in silico</i> vorhergesagte miRNA-Bindestellen in ADME-Genen. ....	82
Tab. 39: Zusammenfassung der Auswahlkriterien für die untersuchten miRNAs in HepaRG-Zellen. ....	84
Tab. 40: Verteilung von differenziell exprimierten miRNAs in cytokinbehandelten HepaRG-Zellen. ....	93
Tab. 41: Übersicht über gemeinsame miRNAs der gepoolten Leberproben sowie IL-6 und IL-1β-behandelten HepaRG-Zellen. ....	96



### Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei meinen beiden Betreuern Prof. Ulrich Zanger und Prof. Robert Lukowski für ihre Unterstützung während meiner Promotion bedanken.

Uli danke ich vor allem für die ausgezeichnete Betreuung, Bereitstellung des interessanten Themas, die Chance viele neue Sachen kennenzulernen und dass er mich immer gefördert hat. Außerdem danke ich ihm, dass ich 2018 die Möglichkeit hatte zum MDO nach Japan zu reisen.

Robert danke ich für seine gute Erreichbarkeit und Bereitschaft meine Doktorarbeit extern von Seiten der Universität Tübingen zu betreuen und zu begutachten.

Herzlichen Dank an Prof. Matthias Schwab für die Möglichkeit, die Dissertation am Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie (IKP) in Stuttgart anfertigen zu können.

Dr. Kathrin Klein möchte ich für ihren Rückhalt, ihre Hilfsbereitschaft und Geduld in allen Belangen danken. Sie stand immer mit Rat und Tat zur Seite.

Außerdem möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Zanger Dr. Ryoichi Fujiwara, Tamara Heintze, Britta Klumpp, Igor Liebermann, Dr. Kyoko Momoi, Dr. Chang Ryu, Dr. Maria Thomas und Dr. Alena Vanduchová für die lehrreiche und angenehme Zeit am IKP bedanken.

Dr. Oliver Burk danke ich für die Organisation der Hepatozyten und seine Hilfsbereitschaft.

Bei Dr. Ute Hofmann und Markus König möchte ich mich für die Messung und Analyse der CYP-Enzymaktivitäten am IKP bedanken.

Dr. Florian Büttner und Dr. Stefan Winter danke ich für ihre Hilfe bei statistischen Fragen aller Art.

PD Dr. Albert Braeuning und Christine Meckert vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin danke ich für den freundlichen Empfang während meiner Zeit in Berlin und die Möglichkeit die Methode 2D-Western Blot kennenlernen zu dürfen. Christine Meckert danke ich außerdem für die Anfertigung der 2D-Western Blots.

Meinen Dank möchte ich auch meiner Mittagsessenstruppe aussprechen. Wir hatten immer großartige und unterhaltsame Diskussionen beim Mittagessen.

## Danksagung

---

Des Weiteren danke ich allen IKP Doktoranden und Mitarbeitern, die mich die letzten Jahre begleitet, unterstützt und eine tolle Zeit sowohl bei der Arbeit als auch in der Freizeit bereitet haben.

Ich danke auch meinen Freunden und meiner Familie, die immer für mich da waren und mir geholfen haben. Zuletzt möchte ich Wilko Kugler für sein tiefes Verständnis, seine Geduld und Motivation danken, die meine Promotion erst möglich gemacht haben.