

**Auswirkungen einer
Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation auf
die mRNA- und microRNA-Expressionsmuster
im oberen Dünndarm**

-

**Untersuchungen zu Adaptationsprozessen im
jejunalen Gewebe**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Henrike Hedwig Bruckmüller

Kiel 2016

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Tag der mündlichen Prüfung:

05. Februar 2016

Zum Druck genehmigt:

05. Februar 2016

gez.

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl
(Dekan)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie der Adipositas	1
1.2 Definition der Adipositas.....	1
1.3 Ursachen der Adipositas	2
1.4 Therapie der Adipositas	2
1.5 Der proximale Roux-en-Y-Magen-Bypass.....	3
1.6 Mechanismen, die zur metabolischen Verbesserung nach RYGB beitragen.....	5
1.6.1 Der Einfluss von Darmhormonen	6
1.6.2 Der Einfluss von Gallensäuren	7
1.6.3 Änderung des intestinalen Mikrobioms.....	7
1.6.4 Änderung des Energieumsatzes	8
1.6.5 Änderung der Nahrungspräferenz	8
1.6.6 Änderung der neuroendokrinen Signalübertragung	9
1.7 Adaptationsprozesse im Dünndarm bei Kurzdarm-Syndrom	10
1.8 Adaptationsprozesse im oberen Dünndarm nach RYGB	11
1.9 microRNAs	12
1.9.1 Biogenese und Reifung von microRNAs	13
1.9.2 Posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs.....	15
1.10 Zielsetzung.....	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.2 <i>Screening</i> der mRNA- und microRNA-Expression.....	17
2.2.1 Kits, Chips, Arrays	17
2.2.2 Geräte.....	17
2.2.3 Software	18
2.2.4 Patientenrekrutierung und Probenpräparation	18
2.2.5 Isolation von Gesamt-RNA inklusive der microRNA.....	19
2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	20
2.2.7 Untersuchung der genomweiten mRNA-Expression	21
2.2.7.1 Durchführung des Microarray-Experiments	21

2.2.7.2	Auswertung der Microarray-Daten	22
2.2.7.3	Hauptkomponentenanalyse differenziell exprimierter mRNAs	23
2.2.7.4	Hierarchische Clusteranalyse differenziell exprimierter mRNAs	24
2.2.7.5	Überrepräsentationsanalyse von <i>Gene Ontology</i> (GO)-Termen.....	24
2.2.7.6	Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)	25
2.2.7.7	Reverse Transkription der mRNA	26
2.2.7.8	Ermittlung einer geeigneten endogenen Kontrolle für die qRT-PCR.....	27
2.2.7.9	Validierung ausgewählter Gene mittels qRT-PCR	28
2.2.8	Untersuchung der genomweiten microRNA-Expression	30
2.2.8.1	Reverse Transkription der microRNA	30
2.2.8.2	Präamplifikation der cDNA	31
2.2.8.3	Durchführung der microRNA-Expressionsanalyse.....	31
2.2.8.4	Datenanalyse der genomweiten microRNA-Expressionsmuster	31
2.2.8.5	Hauptkomponentenanalyse ausgewählter microRNAs	32
2.2.8.6	Validierung ausgewählter microRNAs mittels individueller TaqMan® Assays.....	32
2.3	Identifizierung potentieller microRNA-mRNA-Interaktionen	33
2.3.1	Korrelationsanalyse der mRNA- und microRNA-Expressionsdaten	33
2.3.2	microRNA-Zielgen-Vorhersage	34
2.4	Untersuchung der spezifischen Bindung von miR-130a, miR-301a und miR-454 an die BCMO1-3'-UTR	35
2.4.1	Kits, Verbrauchsmaterial	35
2.4.2	Puffer und Lösungen	36
2.4.3	Geräte.....	36
2.4.4	Enzyme.....	36
2.4.5	Primersequenzen	37
2.4.6	Plasmide	37
2.4.7	Zellkulturmedien	38
2.4.8	microRNAs/Pre-miRs	39
2.4.9	Isolation der genomischen DNA	39
2.4.10	Klonierung der BCMO1-3'-UTR in den pmirGLO Vektor	39
2.4.11	Bakterienkultur.....	40
2.4.12	Herstellung kompetenter Bakterien	41
2.4.13	Hitzeschock-Transformation	41
2.4.14	Präparation von Plasmid-DNA.....	42
2.4.15	Gezielte Mutagenese.....	43

2.4.16 Zellkultur	44
2.4.17 Auftauen der Zellen	44
2.4.18 Passagieren und Zählen der Zellen.....	44
2.4.19 Einfrieren der Zellen	45
2.4.20 Luciferase-Reportergen-Assay	45
2.5 Effekt von miR-301a und miR-454 auf die Translation von BCMO1	47
2.5.1 Kits, Verbrauchsmaterial	47
2.5.2 Puffer, Lösungen	47
2.5.3 Geräte.....	48
2.5.4 Software	48
2.5.5 Antikörper	48
2.5.6 Transiente Transfektion der CaCo2 Zellen mit microRNAs.....	48
2.5.7 Proteinisolation und Bestimmung des Proteingehaltes	49
2.5.8 Western-Blot.....	49
2.6 Untersuchung des Einflusses von Gallensäuren auf BCMO1	51
2.6.1 Gallensäuren	51
2.6.2 Software	51
2.6.3 Versuch zur Untersuchung des Einflusses von Gallensäuren.....	51
2.6.4 <i>In-silico</i> Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen	52
2.7 Statistik.....	52
3 Ergebnisse.....	53
3.1 Untersuchung der mRNA- und microRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms von RYGB-Patienten.....	53
3.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte.....	53
3.1.2 Analyse der mRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms.....	54
3.1.3 Hauptkomponentenanalyse der differenziell exprimierten mRNAs	56
3.1.4 Analyse der microRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms	58
3.1.5 Hauptkomponentenanalyse der differenziell exprimierten microRNAs	60
3.1.6 Jejunum vs. Duodenum - Untersuchung der physiologischen Ausgangssituation im oberen Dünndarm	61
3.1.7 Roux-Schenkel vs. Duodenum – Löst eine Veränderung der anatomischen Position im Darm Adaptationsprozesse aus?	65
3.1.8 Roux-Schenkel vs. Jejunum – Führt ein RYGB zu Adaptationsprozesse im jejunalen Gewebe?	68
3.1.8.1 Vorhergesagte Regulation von BCMO1 durch microRNAs.....	72
3.2 Validierung der mRNA-Expression ausgewählter Kandidatengene	74

3.2.1	Ermittlung einer geeigneten endogenen Kontrolle für die qRT-PCR.....	74
3.2.2	Gene der intestinalen Fettverdauung und –absorption	75
3.2.3	Gene der Cholesterolsynthese	79
3.2.4	Gene, welche die Cholesterolumstände regulieren	82
3.2.5	Gene des Kohlenhydratmetabolismus.....	84
3.2.6	Gene, die für Darmhormone kodieren	87
3.2.7	Der Effluxtransporter ABCB1	88
3.2.8	Gene mit Beteiligung an der intestinalen Vitamin- und Mikronährstoffabsorption.....	89
3.2.9	Gene des Retinolmetabolismus.....	91
3.3	Validierung der Expression ausgewählter microRNAs.....	93
3.4	Ursachen für die Adaptationsprozesse im jejunalen Gewebe nach RYGB.....	95
3.4.1	Validierung der vorhergesagten Interaktion von miR-130a, miR- 301a und miR-454 mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR	95
3.4.2	Interaktion von miR-130a mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR	96
3.4.3	Interaktion von miR-301a mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR	96
3.4.4	Interaktion von miR-454 mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR	98
3.4.5	Einfluss von miR-301a und miR-454 auf den <i>BCMO1</i> -Proteingehalt....	100
3.5	Einfluss von Gallensäuren auf <i>BCMO1</i>	101
3.5.1	Vorhersage potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen in der Promotorregion von <i>BCMO1</i> und miR-301a	104
4	Diskussion.....	105
4.1	Jejunum vs. Duodenum - Die physiologische Ausgangssituation im oberen Dünndarm.....	105
4.2	Roux-Schenkel vs. Duodenum – Anpassung an die anatomischen Veränderungen	107
4.3	Roux-Schenkel vs. Jejunum – Adaptationsprozesse im jejunalen Gewebe nach RYGB.....	112
4.4	Fazit.....	118
5	Zusammenfassung	120
	Literaturverzeichnis	124
	Anhang	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Darstellung des oberen Dünndarms vor (A) und nach (B) erfolgter proximaler Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation.....	4
Abbildung 2	Darstellung der bisher bekannten Mechanismen, die zur metabolischen Verbesserung nach RYGB beitragen könnten.....	6
Abbildung 3	Biogenese und Reifung von microRNAs	14
Abbildung 4	Positionen der intestinalen Probenentnahme.....	19
Abbildung 5	Differenziell exprimierte mRNAs in den drei Gewebevergleichen.....	55
Abbildung 6	mRNAs, die in mehr als einem Vergleich eine differenzielle Regulation aufwiesen.....	56
Abbildung 7	Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Expressionsdaten	57
Abbildung 8	Differenziell exprimierte microRNAs in den drei Gewebevergleichen.....	59
Abbildung 9	microRNAs, die in mehr als einem Gewebevergleich eine differenzielle Regulation aufwiesen.....	60
Abbildung 10	Hauptkomponentenanalyse der microRNA-Expressionsdaten	61
Abbildung 11	Jejunum und Duodenum weisen vor der RYGB-Operation ähnliche mRNA-Expressionsprofile auf.....	62
Abbildung 12	Überrepräsentierte GO-Terme - Jejunum vs. Duodenum.....	63
Abbildung 13	Validierte und zusätzlich vorhergesagte Interaktionen der differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs - Jejunum vs. Duodenum.....	64
Abbildung 14	Roux-Schenkel und Duodenum unterscheiden sich deutliche in ihren mRNA-Expressionsprofilen.....	66
Abbildung 15	Überrepräsentierte GO-Terme - Roux-Schenkel vs. Duodenum.....	67
Abbildung 16	Roux-Schenkel und Jejunum weisen deutliche Unterschiede in ihren mRNA-Expressionsprofilen auf.....	69
Abbildung 17	Überrepräsentierte GO-Terme - Roux-Schenkel vs. Jejunum.....	70
Abbildung 18	Validierte und zusätzlich vorhergesagte Interaktionen der differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs - Roux-Schenkel vs. Jejunum	71
Abbildung 19	Korrelation der <i>BCMO1</i> -mRNA mit der Expression von (A) miR-130a, (B) miR-301a und (C) miR-454.....	73
Abbildung 20	mRNA-Expression potentieller endogener Kontrollen	75
Abbildung 21	Modifizierte KEGG <i>Pathway</i> Karte „ <i>fat digestion and absorption</i> “	76
Abbildung 22	Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene von Fettverdauung und –absorption	78
Abbildung 23	Modifizierte KEGG <i>Pathway</i> Karte „ <i>steroid biosynthesis</i> “	80

Abbildung 24	Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene der Cholesterolsynthese.....	81
Abbildung 25	Schematische Darstellung der Regulation der Cholesterolsynthese durch SREBF2, STARD4 und INSIG1.....	82
Abbildung 26	Microarray und qRT-PCR-Analysen von Genen, welche die Cholesterolsynthese kontrollieren.....	83
Abbildung 27	Gene mit Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsel	85
Abbildung 28	Microarray und qRT-PCR-Analysen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus.....	86
Abbildung 29	Microarray und qRT-PCR-Analysen der Gene, die für PYY und Proglukagon kodieren	87
Abbildung 30	Funktion von ABCB1 im Darm.....	88
Abbildung 31	Microarray und qRT-PCR-Analysen von ABCB1	88
Abbildung 32	Modifizierte KEGG <i>Pathway</i> Karte „ <i>vitamin digestion and absorption</i> “	90
Abbildung 33	Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene der Vitamin- und Mikronährstoffabsorption	91
Abbildung 34	Modifizierte KEGG <i>Pathway</i> Karte „ <i>retinol metabolism</i> “	92
Abbildung 35	Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene des Retinolmetabolismus.....	93
Abbildung 36	Expressionsunterschiede von miR-130a, miR-301 und miR-454 zwischen Roux-Schenkel und Jejunum	94
Abbildung 37	Interaktion von miR-130a mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR - Luciferase-Assay	96
Abbildung 38	Interaktion von miR-301a mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR - Luciferase-Assay	97
Abbildung 39	Schematische Darstellung der identifizierten Bindestellen von miR-301a in der <i>BCMO1</i> -3'-UTR	98
Abbildung 40	Interaktion von miR-454 mit der <i>BCMO1</i> -3'-UTR - Luciferase-Assay	99
Abbildung 41	Western-Blot zur Überprüfung des Einflusses von miR-301a und miR-454 auf den <i>BCMO1</i> -Proteingehalt	100
Abbildung 42	Einfluss von Gallensäuren auf die Expression von miR-301a in CaCo2 Zellen	102
Abbildung 43	Einfluss von Gallensäuren auf die mRNA-Expression von <i>BCMO1</i> in CaCo2 Zellen.....	103
Abbildung 44	Cholsäure vermindert den relativen <i>BCMO1</i> -Proteingehalt in CaCo2 Zellen.....	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	TaqMan® Assays des TaqMan® Array Human Endogenous Control Panels.....	28
Tabelle 2	TaqMan® Assays für die ausgewählten Kandidatengene	29
Tabelle 3	Charakteristika der RYGB-Patienten	53
Tabelle 4	Gene der intestinalen Fettverdauung und-absorption – qRT-PCR	77
Tabelle 5	Gene der Cholesterolsynthese - qRT-PCR	80
Tabelle 6	Gene, die an der Regulation der Cholesterolumöostase beteiligt sind – qRT-PCR.....	83
Tabelle 7	Gene des Kohlenhydratmetabolismus – qRT-PCR.....	85
Tabelle 8	Gene mit Beteiligung an der intestinalen Vitamin- und Mikronährstoffabsorption –qRT-PCR	90
Tabelle 9	Gene des Retinolmetabolismus – qRT-PCR.....	92

Anhang

Tabelle 1	Darstellung der 29 differenziell exprimierten mRNAs (27 heraufreguliert und 2 herunterreguliert) zwischen Jejunum und Duodenum vor RYGB basierend auf den Transkriptomdaten der Affymetix Microarrays bezogen auf das Duodenum	142
Tabelle 2	Darstellung der 86 differenziell exprimierten mRNAs (68 heraufreguliert und 18 herunterreguliert) zwischen Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB und Duodenum vor RYGB basierend auf den Transkriptomdaten der Affymetix Microarrays bezogen auf das Duodenum	143
Tabelle 3	Darstellung der 68 differenziell exprimierten mRNAs (24 heraufreguliert und 44 herunterreguliert) zwischen Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB und Jejunum vor RYGB basierend auf den Transkriptomdaten der Affymetix Microarrays bezogen auf das Jejunum	145
Tabelle 4	Darstellung der 129 differenziell exprimierten microRNAs (123 heraufreguliert und 6 herunterreguliert) im Vergleich Jejunum vs. Duodenum vor RYGB (linke Spalte) und der 111 differenziell exprimierten microRNAs (3 heraufreguliert und 108 herunterreguliert) im Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum (rechte Spalte) basierend auf den microRNA <i>screening</i> Daten	147
Tabelle 5	Darstellung der überrepräsentierten <i>Gene Ontology</i> Terme, sowie der jeweils assoziierten Gene des Vergleichs Jejunum vs. Duodenum.....	150

Tabelle 6	Darstellung der überrepräsentierten <i>Gene Ontology</i> Terme, sowie der jeweils assoziierten Gene des Vergleichs Roux-Schenkel vs. Duodenum	151
Tabelle 7	Darstellung der überrepräsentierten <i>Gene Ontology</i> Terme, sowie der jeweils assoziierten Gene des Vergleichs Roux-Schenkel vs. Jejunum	153

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCMO1	β -Carotene Oxygenase 1/ β -Carotene 15,15'-Monooxygenase 1
BMI	Körpermasseindex
BPD-DS	biliopankreatische Diversion mit duodenalem Switch
CA	Cholsäure
CDCA	Chendodeoxycholsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> Wert
DAG	Deutschen Adipositas Gesellschaft
DCA	Deoxycholsäure
DDG	Deutsche Diabetes Gesellschaft
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
DGEM	Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dUTP	Deoxyuridintriphosphate
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
FCS	fetales Kälberserum
FDR	<i>false discovery rate</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GB	Magenband
GCOS	GeneChip operating software
GO	<i>Gene Ontology</i>
GRCh38	Genome Reference Consortium Human Genome build 38
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
LCA	Lithocholsäure
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
OD	optischen Dichte

PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PC	principal component (Hauptkomponente)
PCA	<i>principal component analysis</i> (Hauptkomponentenanalyse)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP _i	Pyrophosphat
pre-miRNA	precursor-microRNA
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
pri-miRNA	Primäres Transkript der microRNA
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative Realtime-PCR
RMA	<i>robust multi-array average</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RYGB	Roux-en-Y-Magen-Bypass
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Schlauchmagen
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCM	Tris HCl, CaCl ₂ , MgCl ₂
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLDA	TaqMan® Array Micro Fluidic Cards
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumenprozent
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Adipositas

Die Zunahme von Übergewicht und Adipositas ist ein weltweites Gesundheitsproblem: laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat sich die Anzahl an adipösen Menschen seit 1980 fast verdoppelt¹. 2008 litten mehr als 1,4 Milliarden Erwachsene mit einem Lebensalter über zwanzig Jahren an Übergewicht, wovon ca. 500 Millionen als adipös galten (siehe Definition unter 1.2). Auch für Deutschland wurde eine Erhöhung der Adipositas-Prävalenz in der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2011 gezeigt. Während im Jahr 1998 noch 19,5% der Männer und 23,1% der Frauen eine Adipositas aufwiesen, waren es im Jahr 2011 bereits 23,3% der Männer und 23,9% der Frauen^{1,2}.

Die Adipositas und deren assoziierte Komorbiditäten führen neben den gesundheitlichen Problemen zu einer zunehmenden Kostenbelastung der Gesundheitssysteme. Die durch Adipositas und assoziierte Erkrankungen verursachte Gesamtkostenbelastung wurde in Deutschland im Jahr 2003 auf mindestens 13 Milliarden Euro geschätzt^{3,4} und diese wird Berechnungen der WHO zur Folge bis 2020 auf mindestens 25,7 Milliarden Euro ansteigen^{5,6}.

1.2 Definition der Adipositas

Die Deutsche Adipositas Gesellschaft (DAG) definiert Adipositas als eine über das Normalmaß hinausgehende Vermehrung des Körperfettes³. Der Körpermasseindex (*Body Mass Index* (BMI)) dient als Beurteilungsgrundlage für die Gewichtsklassifikation und wird als Quotient aus Gewicht und dem Quadrat der Körpergröße berechnet (kg/m^2). Übergewicht wird definiert als BMI von 25-29,9 kg/m^2 . Die Adipositas beginnt ab einem BMI von 30 kg/m^2 und wird weiter unterteilt in Adipositas Grad I (BMI 30-34,9 kg/m^2), Adipositas Grad II (BMI 35-39,9 kg/m^2) und Adipositas Grad III (BMI ≥ 40 kg/m^2). Mit zunehmendem BMI steigt auch das Risiko für Folgeerkrankungen an^{1,4}. Ein besonders stark erhöhtes relatives Risiko (> 3-fach) liegt für die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2, Cholezystolithiasis, Dyslipidämie, Insulinresistenz, Fettleber und für das

Schlafapnoe-Syndrom vor. Ein zwei- bis dreifach erhöhtes Risiko besteht für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit, Hypertonie, Gonarthrose, Gicht und einer Refluxösophagitis.

1.3 Ursachen der Adipositas

Die Ursache der Adipositas liegt grundsätzlich in einem Ungleichgewicht zwischen Energieaufnahme und Energieverbrauch. Als biologische, psychosoziale und umweltbedingte Risikofaktoren gelten genetische Determinanten (z.B. Varianten im Leptin-Gen^{3,5} oder im Melanocortin-4-Rezeptor-Gen⁷), der Lebensstil (Bewegungsmangel, Fehlernährung), die ständige Verfügbarkeit von Nahrung, Schlafmangel, Stress, depressive Erkrankungen, niedriger Sozialstatus, Essstörungen (z.B. *Binge-Eating-Disorder*, *Night-Eating-Disorder*), endokrine Erkrankungen (z.B. Hypothyreose, Cushing-Syndrom) aber auch unerwünschte Arzneimittelwirkungen bei der Einnahme einiger Medikamente, wie Antidepressiva, Neuroleptika, Phasenprophylaktika, Antiepileptika, Antidiabetika, Glukokortikoide, einiger Kontrazeptiva oder Betablocker³. Meist ist für die Entstehung einer Adipositaserkrankung das Zusammenspiel mehrerer der oben genannten Faktoren ursächlich.

1.4 Therapie der Adipositas

Um ein Fortschreiten der „Adipositas-Epidemie“ einzudämmen und somit das Risiko für die Gesundheit und die Kosten für die Gesellschaft so gering wie möglich zu halten, ist neben Präventionsmaßnahmen eine effektive Therapie einer bestehenden Adipositas notwendig. Als Therapieziel wird eine langfristige Gewichtsreduktion und eine damit verbundene Verbesserung adipositasassoziierter Risikofaktoren und Krankheiten angestrebt³. Die konservative Adipositastherapie setzt sich aus Ernährungs-, Bewegungs- und Verhaltenstherapie zusammen. Wenn mit diesem Basisprogramm zur Lebensstiländerung keine oder nur eine unzureichende Gewichtsreduktion erreicht wird, ist eine adjuvante medikamentöse Therapie mit dem Lipasehemmer Orlistat indiziert³. Allerdings wird mit einer Orlistatbehandlung nur ein sehr moderater Gewichtsverlust von unter 5 kg im ersten Jahr erzielt, zudem scheint die Wirksamkeit bei einer länger andauernden Behandlung nicht mehr nachweisbar zu sein^{3,8}. Bei stark adipösen Patienten führt diese Kombination aus Basis- und

medikamentöser Therapie häufig nicht zum gewünschten langfristigen Erfolg. Für diese Patienten, die meist an einer Adipositas Grad III oder einer Adipositas Grad II mit erheblichen Komorbiditäten wie z.B. Diabetes mellitus Typ 2 leiden, stellen adipositaschirurgische Eingriffe häufig die einzige Möglichkeit für eine effektive und langanhaltende Gewichtsreduktion dar³.

Die Anzahl dieser Eingriffe hat in Deutschland in den vergangenen Jahren deutlich zugenommen^{9,10}. In der S3-Leitlinien zur „Prävention und Therapie der Adipositas“, die von der Deutschen Adipositas Gesellschaft (DAG) in Zusammenarbeit mit der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG), der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) und der Deutschen Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) herausgegeben wurde, werden als effektive Standardverfahren folgende operative Methoden genannt: das Magenband (GB), der Schlauchmagen (SG), der Roux-en-Y-Magen-Bypass (RYGB) und die biliopankreatische Diversion mit und ohne duodenalem Switch (BPD-DS, BDP)^{11,12}. Diese Operationsmethoden werden in restriktive Verfahren (Magenband, Schlauchmagen), in malabsorptive Verfahren (biliopankreatische Diversion) und in kombinierte Verfahren (Roux-en-Y-Magen-Bypass, biliopankreatische Diversion mit duodenalem Switch) unterteilt. Die Gewichtsreduktion nach dem Eingriff unterscheidet sich zwischen den Operationsmethoden deutlich¹³. So führte das Magenband zu einer Gewichtsreduktion von 41-54%, der Schlauchmagen von 59,8%, der Roux-en-Y-Magen-Bypass von 62-75% und die biliopankreatische Diversion mit duodenalem Switch von 66-74%^{11,14,15}.

1.5 Der proximale Roux-en-Y-Magen-Bypass

Das in der Adipositaschirurgie weltweit am häufigsten angewendete Verfahren ist der Roux-en-Y-Magen-Bypass, der sowohl eine restriktive als auch eine malabsorptive Komponente aufweist¹⁰. Während der Operation des proximalen Roux-en-Y-Magen-Bypasses wird der Magen so durchtrennt, dass am Ösophagus ein kleinkurvaturseitiger Magenanteil verbleibt (siehe Abbildung 1). Dieser Magenpouch hat ein Volumen von ca. 15 ml und beschränkt dadurch die aufgenommene Menge an Nahrung pro Mahlzeit. Der von der Nahrungspassage ausgeschlossene Restmagen verbleibt *in-situ*¹⁶. Das Jejunum wird ca. 50 cm aboral des Magen-Pylorus durchtrennt und der aborale Teil des Jejunums wird hochgezogen und mit dem

Magenpouch verbunden. Dieser Teil des Jejunums wird als Roux-Schenkel oder alimentärer Schenkel bezeichnet und kommt mit der Nahrung, nicht aber mit den Verdauungsenzymen und Gallensäuren in Berührung. 150 cm unterhalb der gastro-jejunalen Anastomose wird der 50 cm lange biliopankreatische Schenkel, bestehend aus dem Duodenum und dem proximalen Teil des Jejunums, mit dem Roux-Schenkel anastomosiert. Ab diesem Punkt vermischen sich die Nahrungsbestandteile mit Verdauungsenzymen und Gallensäuren in dem gemeinsamen Schenkel. Durch diese Roux-en-Y-Gastrojejunostomie umgeht die Nahrung nach der Operation den Großteil des Magens, das Duodenum und den proximalen Teil des Jejunums.

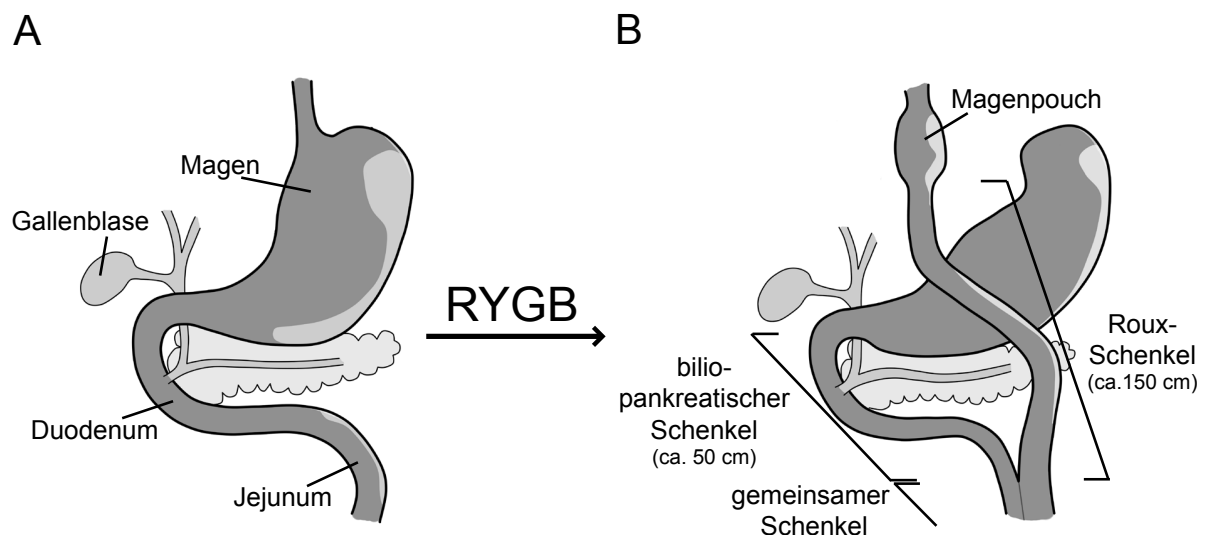


Abbildung 1 Darstellung des oberen Dünndarms vor (A) und nach (B) erfolgter proximaler Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation.

Perioperativ können Komplikationen wie Anastomosen-Insuffizienzen, Blutungen und Darmverschluss auftreten¹⁷. Langfristig werden bei Patienten häufig das Dumping-Syndrom, die gastroösophageale Refluxkrankheit und Veränderungen der Pharmakokinetik von Arzneistoffen sowie Defizite in der Vitamin- und Mikronährstoffabsorption beobachtet¹⁷⁻¹⁹.

Allerdings überwiegt in der Regel der Nutzen einer indizierten RYGB-Operation deutlich dem Risiko. Neben der unter 1.4 beschriebenen effektiven und langfristigen Reduktion des Übergewichtes, wirkt sich die Operation positiv auf die mit dem Übergewicht assoziierten Risikofaktoren und Komorbiditäten aus. So führt der RYGB zu einer Verbesserung oder gar Remission von Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 bei ca. 66%, von Bluthochdruck bei ca. 38%, von Dyslipidämie bei ca. 60%

und des Schlafapnoe-Syndroms bei ca. 94% der Patienten^{11,20}. Im Hinblick auf diese positiven Effekte, die über die reine Gewichtsreduktion hinausgehen, wird die RYGB-Operation immer häufiger dem Oberbegriff „metabolische Chirurgie“ statt „Adipositaschirurgie“ zugeordnet²¹.

1.6 Mechanismen, die zur metabolischen Verbesserung nach RYGB beitragen

Die Mechanismen, die der langfristigen Gewichtsreduktion und den positiven metabolischen Effekten nach RYGB zu Grunde liegen, sind bisher nur zum Teil bekannt. Zunächst wurde angenommen, dass der Gewichtsverlust nach RYGB auf Nahrungsrestriktion durch die verringerte Magenpouch-Kapazität und auf kalorischer Malabsorption im Dünndarm beruht. Die Verbesserung oder gar Remission der Komorbiditäten wurden als gewichtsabhängige Phänomene betrachtet. Gegen einen alleinigen Effekt von mechanischer Restriktion und Malabsorption sprechen allerdings die gewichtsunabhängige Reduktion des Nüchternblutzuckerwerts innerhalb weniger Tage nach RYGB²², sowie die Beobachtungen, dass der Magenpouch keinerlei Speicherfunktion hat²³ und dass nur eine vorübergehend verminderte Kalorienresorption beim proximalen RYGB vorliegt²⁴.

Inzwischen wird angenommen, dass die metabolischen Verbesserungen auf deutlich komplexere physiologische Mechanismen zurückzuführen sind. Dazu zählen insbesondere der Einfluss von Darmhormonen und Gallensäuren, Veränderungen des intestinalen Mikrobioms, des Energieumsatzes, der Nahrungsauswahl sowie der neuroendokrinen Signalübertragung. Diese Mechanismen sollen im Folgenden kurz skizziert werden und sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

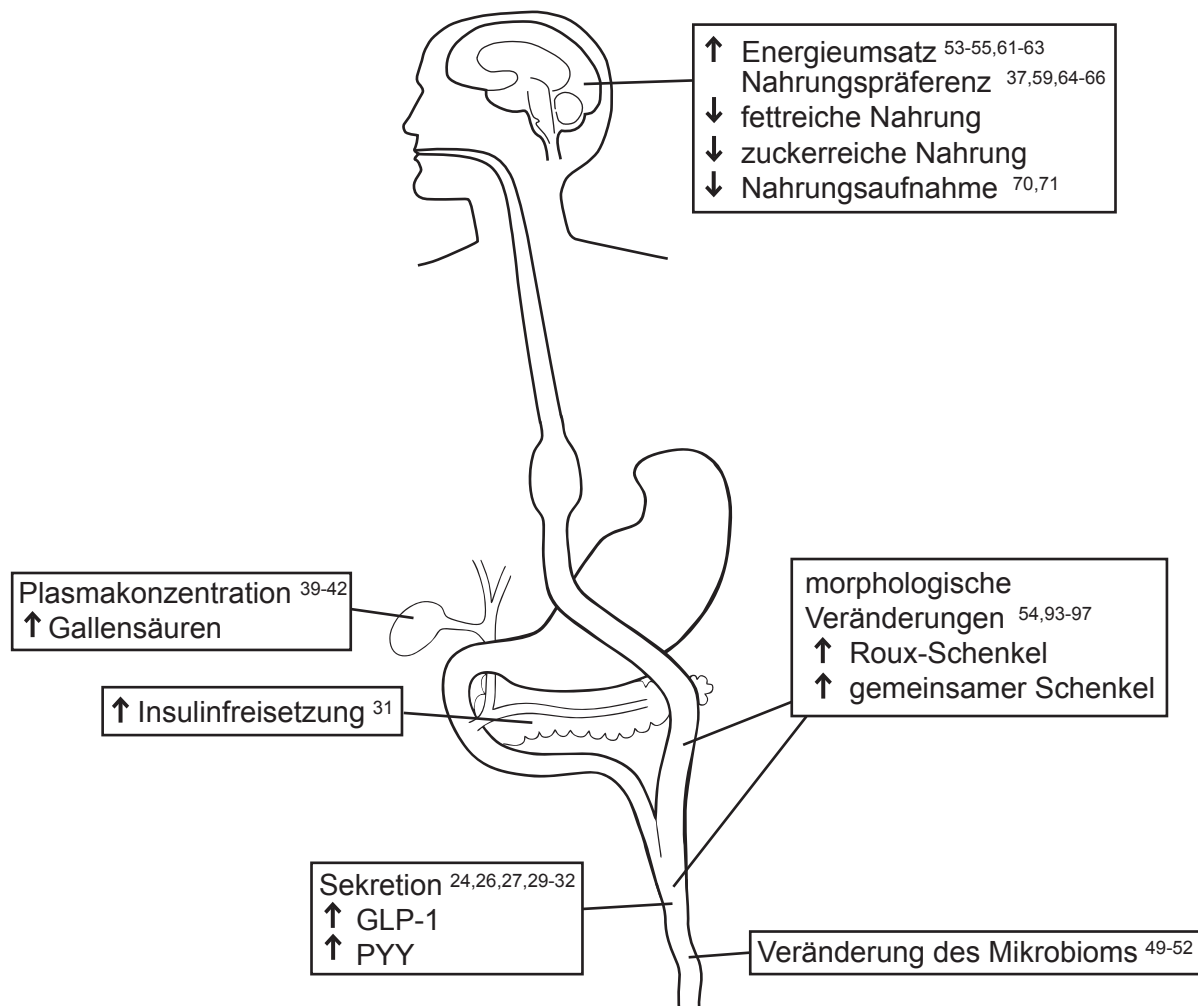


Abbildung 2 Darstellung der bisher bekannten Mechanismen, die zur metabolischen Verbesserung nach RYGB beitragen könnten. (siehe 1.6 und 1.8) Modifiziert nach Miras *et al.* 2013²⁵ und Lutz *et al.* 2014²¹

1.6.1 Der Einfluss von Darmhormonen

Die Änderung der Sekretion von Darmhormonen wie Leptin, Ghrelin, Cholezystokinin, Glucagon-like Peptide 1 (GLP-1) und Peptid Tyrosin Tyrosin (PYY) nach RYGB-Operationen wurde in zahlreichen Studien untersucht^{24,26,27}. Die Ergebnisse für Ghrelin, dem einzigen appetitanregenden Hormon, sind bisher uneinheitlich²⁵. Dagegen wurden Veränderungen in der Sekretion von GLP-1 und PYY nach RYGB-Operationen in allen Studien sowohl im Menschen als auch im Tiermodell gefunden²⁶. Physiologisch steigen die Plasmakonzentrationen der beiden Hormone nach der Nahrungsaufnahme an und führen zu einem reduzierten Hunger- und einem gesteigerten Sättigungsgefühl²⁸. Bei den meisten übergewichtigen Patienten sind allerdings verringerte GLP-1 und PYY-Konzentrationen im Vergleich zu Normalgewichtigen zu finden. Nach RYGB steigen die Plasmakonzentrationen beider

Hormone deutlich an²⁹⁻³². Als eine mögliche Erklärung für die erhöhte Hormonsekretion nach RYGB gilt die Induktion der L-Zellen über den Melanocortin-4-Rezeptor³³ und den G-Protein gekoppelten Gallensäurerezeptor (TGR5)³⁴. Die Spiegel beider Hormone sind positiv mit dem Gewichtsverlust assoziiert^{29,35}. Neben den vermuteten zentralen Effekten von GLP-1 auf Hunger und Sättigung führen die erhöhten GLP-1-Konzentrationen über die Inkretin-Wirkung zu einer verstärkten Insulinfreisetzung aus den β -Zellen des Pankreas³¹. Dies könnte zumindest einen Teil der Erklärung für die schnelle Verbesserung des Diabetes mellitus Typ 2 nach RYGB liefern³⁶. Allerdings zeigen Studien mit spezifischen Inhibitoren, dass z.B. GLP-1 nicht allein für die metabolische Verbesserung nach RYGB ursächlich sein kann^{37,38}.

1.6.2 Der Einfluss von Gallensäuren

Neben den Darmhormonen werden Gallensäuren am häufigsten als mögliche Mediatoren genannt, die für die Effekte einer RYGB-Operation verantwortlich sein können²¹. Adipöse Personen weisen eine verminderte Plasmakonzentration an zirkulierenden Gallensäuren im Vergleich zu normalgewichtigen Personen auf. Durch eine RYGB-Operation normalisieren sich diese Plasmaspiegel sowohl im Menschen als auch im Tiermodell³⁹⁻⁴². Neben der gut beschriebenen Rolle von Gallensäuren bei der intestinalen Absorption von Fetten und fettlöslichen Vitaminen⁴³, rückt ihre Funktion als Signalmolekül immer weiter in den Vordergrund. In verschiedenen Studien konnte über eine Bindung von Gallensäuren an den TGR5 Rezeptor eine Erhöhung der GLP-1 Sekretion und darüber eine Verbesserung der Glukosetoleranz³⁴ und auch eine Erhöhung des Energieumsatzes⁴⁴ gezeigt werden. Die Aktivierung des Farnesoid-X-Rezeptors (FXR) über Gallensäuren führt zu einer Verbesserung von Dyslipidämie und Hyperglykämie⁴⁵, und auch ein Zusammenhang von intestinalem Mikrobiom und der Gallensäuresynthese konnte gezeigt werden⁴⁶.

1.6.3 Änderung des intestinalen Mikrobioms

Zahlreiche Studien aus den letzten Jahren haben gezeigt, dass das intestinale Mikrobiom, die Gesamtheit der Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt, viele metabolische Prozesse induziert oder modelliert⁴⁷. Turnbaugh *et al.*⁴⁸ zeigten 2006, dass das Mikrobiom, welches mit dem Auftreten von Übergewicht assoziiert ist, eine

erhöhte Kapazität zur Ausnutzung der Energie aus der Nahrung aufweist. Nach RYGB-Operationen wurde sowohl in Patienten^{49,50} als auch im Tiermodell^{51,52} eine Verschiebung in der Bakterienzusammensetzung der Darmflora beobachtet. Ein Transfer von Darmbakterien einer RYGB-Maus in den Darm einer nicht operierten Maus, führt bei dieser zu einem Gewichtsverlust⁵². Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, dass das intestinale Mikrobiom einen entscheidenden Beitrag zum klinischen Erfolg von RYGB-Operationen leistet, wobei an der Erforschung kausaler Zusammenhänge zur Zeit intensiv gearbeitet wird²¹.

1.6.4 Änderung des Energieumsatzes

Übergewichtige Personen weisen aufgrund der höheren Körpermasse, der größeren Nahrungsaufnahme und des höheren Energiebedarfs im täglichen Leben einen erhöhten Energieumsatz gegenüber normalgewichtigen Personen auf⁵³. Nach einer Reduktion des Körpergewichtes mittels einer Diät vermindert sich der Energieumsatz dieser Personen und passt sich dem geringeren Nahrungsangebot an, was das Halten des reduzierten Gewichtes erschwert⁵⁴⁻⁵⁹. Nach RYGB-Operationen scheint diese Anpassung nicht im gleichen Maße stattzufinden. In Tierstudien wurde interessanterweise trotz Gewichtsreduktion ein erhöhter Energieumsatz im Vergleich zur Kontrolle beobachtet^{54,55}. Die Datenlage für Patienten nach RYGB ist dagegen uneinheitlich⁶⁰, aber auch hier wurde zum Teil ein erhöhter Energieumsatz beobachtet^{53,61}. Thivel *et al.*⁶² legen nahe, dass bei RYGB-Patienten zumindest die nahrungsinduzierte Thermogenese häufig erhöht ist. Eine mögliche Erklärung für den erhöhten Energieumsatz nach RYGB könnte ein erhöhter Energiebedarf des Dünndarms aufgrund der massiven Hypertrophie nach RYGB liefern^{21,63}.

1.6.5 Änderung der Nahrungspräferenz

Nach der Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation verändert sich zudem die Nahrungspräferenz der Patienten. So wird eine niedrigkalorische Ernährung einer fettreichen vorgezogen^{64,65}. Zusätzlich wird deutlich weniger Zucker aufgenommen⁶⁴⁻⁶⁶. Im Tierexperiment konnten diese Ergebnisse reproduziert werden^{37,59}. Als mögliche Mechanismen werden unter anderem Veränderungen des Geschmacks nach RYGB diskutiert, so verändert sich nach RYGB z.B. das Detektionslevel von Saccharose in der Nahrung⁶⁷.

1.6.6 Änderung der neuroendokrinen Signalübertragung

Die Steuerung von Hunger und Sättigung erfolgt zentral, neben dem Hinterhirn fungiert der *Nucleulus arcuatus* im Hypothalamus als zentrale Schaltstelle⁷. In Studien wurde gezeigt, dass die Signaltransduktion über den Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) essentiell für den Gewichtsverlust nach RYGB ist⁶⁸ und dass sich die Expression von neuroendokrinen Peptiden wie Neuropeptid Y (NPY) und dem α -Melanocortin-stimulierenden-Hormon (α -MSH) nach RYGB verändert⁶⁹. Des Weiteren wurden Änderungen in der dopaminergen Neurotransmission beschrieben, die zu einer Veränderung des Essverhaltens (verminderter Hunger, frühere Sättigung) führen könnten^{70,71}. Da der *Nucleulus arcuatus* in der Nähe zu Gehirnarealen mit inkompletter Blut-Hirn-Schranke liegt, ist er für humorale Signale aus der Peripherie empfänglich. Es wird diskutiert, dass diese humoralen Signale von gastrointestinalen Hormonen wie GLP-1 oder PYY vermittelt werden^{72,73}, die zusätzlich sensorische Informationen über vagale und somatosensorische Afferenzen des Gastrointestinaltraktes an das Gehirn übertragen^{73,74}.

Alle diese komplexen physiologischen Mechanismen tragen mit großer Wahrscheinlichkeit zu den metabolischen Verbesserungen nach einer RYGB-Operation bei. Allerdings sind die kausalen Zusammenhänge von RYGB-Operation, den physiologischen Veränderungen und den molekularen Stoffwechselwegen, die zum Gewichtsverlust und zur metabolischen Verbesserung beitragen, bisher erst wenig erforscht²¹. Auch die Rationale, die hinter den Beobachtungen steht, dass sich das Ausmaß von Mikronährstoffdefiziten und von Veränderungen der Pharmakokinetik einzelner Arzneistoffen nach RYGB zum Teil individuell stark unterscheidet, ist bisher wenig verstanden⁷⁵⁻⁷⁷. Da erst in den letzten Jahren erkannt wurde, dass viele metabolischen Veränderungen nach einem RYGB mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig vom Gewichtsverlust der Patienten auftreten, steht die Untersuchung der entsprechenden Mechanismen noch am Beginn. So wurde der Gastrointestinaltrakt bisher nur in sehr wenigen Studien berücksichtigt, obwohl er am unmittelbarsten von den anatomischen Veränderungen durch die RYGB-Operation betroffen ist. Die Vermutung liegt nahe, dass die Untersuchungen von möglichen intestinalen Adaptationsprozessen, die als Reaktion auf die chirurgische Veränderung nach RYGB auftreten könnten, zur Aufklärung der komplexen

physiologischen Mechanismen beitragen. Eine entsprechende Hypothese wurde ebenfalls von Seeley *et al.*⁷⁸ aufgestellt.

1.7 Adaptationsprozesse im Dünndarm bei Kurzdarm-Syndrom

Die intestinalen Veränderungen durch eine proximale Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation gehen mit einem deutlichen Verlust an Absorptionsoberflächen einher. Daher stellt sich die Frage, ob der Darm in der Lage ist, den Verlust an intestinalen Funktionen zu kompensieren.

Von Patienten mit Kurzdarm-Syndrom ist beispielsweise bekannt, dass der Darm in der Lage ist, durch vielfältige, langanhaltende Adaptationsprozesse zumindest teilweise die verlorenen intestinalen Funktionen zu kompensieren^{79,80}. Das Kurzdarm-Syndrom tritt infolge einer Teilresektion des Darms auf, welche aufgrund von Erkrankungen wie nekrotisierender Enterokolitis, Gastroschisis, intestinaler Atresie oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unumgänglich sein kann⁸¹. Es geht meist mit einer sehr eingeschränkten Absorption von Nährstoffen einher⁸², so dass die Patienten häufig auf eine parenterale Ernährung angewiesen sind. Allerdings verbessert sich die Funktion des Darms in Abhängigkeit vom Status der Erkrankung und der noch vorhandenen Darmoberfläche und deren Funktionsfähigkeit häufig wieder, so dass teilweise sogar die vollständige intestinale Autonomie wiedererlangt wird⁷⁹. Diese Adaptationsprozesse sind durch morphologische Veränderungen der Mukosa gekennzeichnet, wie Hyperplasie und Hypertrophie und führen damit wieder zu einer Vergrößerung der Absorptionsoberfläche^{80,83-86}. Neben dem Darmbereich, der nach der Resektion noch vorhandenen ist⁸⁰, gelten die enterale Stimulation, insbesondere durch komplexe Diäten mit entsprechendem Fettanteil⁸⁷, sowie Hormone wie Somatropin⁸⁸ und Glucagon-like Peptide 2 (GLP-2)⁸⁹ und Wachstumsfaktoren wie der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1 (IGF1) und der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF)⁸⁰ als entscheidend für die Adaptationsprozesse. Ebenso scheint Vitamin A eine wichtige Rolle in der intestinalen Adaptation nach einer Darmresektion zuzuspielen⁹⁰⁻⁹².

1.8 Adaptationsprozesse im oberen Dünndarm nach RYGB

Nach RYGB-Operationen konnten einige Studien ebenfalls Veränderungen zeigen, die auf intestinale, mukosale Adaptationsprozesse hindeuten. So wurden in Patienten⁹³ und im Tiermodell^{54,94-97} morphologische Veränderungen gefunden, die insbesondere durch Hypertrophie und Hyperplasie der Mukosa des Roux-Schenkels gekennzeichnet waren und denen nach einer Darmresektion ähneln. Die vieldiskutierte These, dass Darmhormone entscheidend zu den metabolischen Verbesserungen nach einer RYGB-Operation beitragen, stützt sich zum Großteil auf erhöhte Plasmaspiegel von GLP-1 und PYY, die im Patienten und im Tiermodell nach RYGB gefunden wurden²⁶. Bisher wurden allerdings nur zwei Studien durchgeführt, welche die Expression und Sekretion dieser beiden Hormone nach RYGB direkt im Dünndarm untersuchten. Hansen *et al.*⁹⁶ zeigten in Ratten, dass deren Ileum sowohl eine erhöhte Anzahl an L-Zellen, als auch eine verstärkte Expression der Gene, welche für die beiden Darmhormone kodieren, aufwies. Rhee *et al.*⁹⁸ beobachteten im jejunalen Gewebe von Patienten vor und nach RYGB hingegen keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von Proglukagon und PYY. Neben Darmhormonen wurden außerdem Veränderungen des intestinalen Mikrobioms nach RYGB beschrieben^{49,50,99}. Allerdings geben bisher nur Tierstudien Auskunft über regionspezifische Veränderungen des Mikrobioms im Dünndarm^{52,100}. Andere Studien untersuchten die Expressionsänderung von Glukosetransportern im menschlichen Dünndarm¹⁰¹ und im Tiermodell^{63,94,102}, da angenommen wurde, dass Gewichtsreduktion und Verbesserung der Komorbiditäten nach RYGB durch eine verminderte Glukoseabsorption aus dem Darm verursacht werden könnten. Diese Studien führten allerdings zu heterogenen Ergebnissen, von denen kein allgemeiner Mechanismus abgeleitet werden kann. Die bisher umfangreichste Studie, die mRNA-Expression und Proteinmengen einer größeren Anzahl glykolytischer Enzyme sowie solcher der Cholesterolumöostase betrachtete, wurde von Saeidi *et al.*⁶³ in Ratten durchgeführt. Diese Studie gab erste Hinweise auf eine Erhöhung des Energiestoffwechsels im Gewebe des Roux-Schenkels nach RYGB.

Die genannten Studien geben zwar erste Hinweise darauf, dass nach einer RYGB-Operation Adaptationsprozesse im Darm ablaufen könnten, allerdings beschränken sich diese Studien meist auf die Untersuchung sehr spezifischer Aspekte und wurden zum Großteil im Tiermodell durchgeführt. Aus diesem Grund fehlen umfassende

Daten zum molekularbiologischen Hintergrund von intestinalen Adaptationsprozessen, die nach einem RYGB im humanen Gewebe ablaufen. Eine Untersuchung der genomweiten mRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms vor und nach RYGB könnte Hinweise geben, welche biologischen Prozesse sich nach einem RYGB, insbesondere in Roux-Schenkel, verändern und könnten so zur weiteren Aufklärung der positiven metabolischen Effekte einer RYGB-Operation beitragen.

1.9 microRNAs

Neben der Aufklärung der veränderten mRNA-Expressionsprofile, könnte eine Untersuchung von regulatorischen Faktoren, welche möglicherweise an den intestinalen Adaptationsprozessen nach RYGB beteiligt sind, von großem Interesse sein. So wurde bereits gezeigt, dass eine RYGB-Operation einen Einfluss auf die microRNA Expression hat ¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Bei microRNAs handelt es sich um kurze, nichtkodierende, einzelsträngige RNAs von 19-25 Nukleotiden, die sowohl in Tieren und Pflanzen als auch in einzelligen Eukaryoten exprimiert werden ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. In der aktuellen Version der microRNA Datenbank miRBase (www.mirbase.org, Version 21: Juni 2014) sind 2588 reife humane microRNAs dokumentiert. Es wird angenommen, dass microRNAs durch die posttranskriptionelle Regulation von ca. 30% aller Gene ¹⁰⁹⁻¹¹² die Robustheit von biologischen Systemen gewährleisten, wenn deren Gleichgewicht durch Umwelteinflüsse oder genetische Faktoren gestört wird ¹¹³. Bisher wurden lediglich drei Studien veröffentlicht, die microRNA-Expressionsmuster im Kontext mit RYGB-Operationen untersucht haben. *Wu et al.* ¹⁰³ postulierten, dass microRNAs nach einer RYGB-Operation entscheidend zu der Einstellung eines neuen metabolischen Gleichgewichts im Körper beitragen und zeigten einen deutlichen Einfluss des RYGB auf die zirkulierenden microRNAs im Plasma von Ratten. *Lirun et al.* ¹⁰⁴ konnten in Patienten nach RYGB, welche an Diabetes mellitus Typ 2 litten, eine Veränderung des microRNA-Profiles im Serum beobachten. *Kwon et al.* ¹⁰⁵ untersuchten in Ratten die microRNA-Profile im Hypothalamus und im Herzen und fanden ebenfalls Veränderungen nach RYGB. Im Zusammenhang mit intestinalen Adaptationsprozessen wurden zudem bei Kurzdarm-Syndrom bereits ein positiver Effekte einzelner microRNAs beschrieben ¹¹⁴. Aus diesen Gründen liegt die

Annahme nahe, dass microRNAs auch an intestinalen Adaptationsprozessen nach RYGB beteiligt sein könnten, was bisher allerdings noch in keiner Studie untersucht wurde.

1.9.1 Biogenese und Reifung von microRNAs

Die Gene, welche für microRNAs kodieren, liegen in Exonen bzw. Intronen von Protein-kodierenden Sequenzen oder in nicht kodierenden Bereichen. Sie werden in der Regel durch die RNA Polymerase II¹¹⁵, zum Teil aber auch durch die RNA Polymerase III transkribiert¹¹⁶. Das primäre Transkript, die pri-miRNA, die bis zu mehreren 1000 Basen lang sein kann¹¹⁷, besteht aus einer oder mehreren Haarnadelstrukturen (*stem loop*)¹¹⁸, aus denen durch weitere Prozessierung eine oder mehrere reife microRNAs hervorgehen¹⁰⁹ (siehe Abbildung 3). Nach Anheftung einer 7-Methylguanosin-Kappe an das 5'-Ende und Polyadenylierung des 3'-Endes wird die pri-miRNA noch im Zellkern vom Mikroprozessor-Komplex zur 60-70 Nukleotid langen pre-miRNA (*precursor-microRNA*) umgesetzt¹¹⁹. Die pre-miRNAs weisen eine typische Haarnadelstruktur mit phosphoryliertem 5'-Ende und einem zwei Nukleotide langen Überhang am 3'-Ende auf¹²⁰, welcher von dem Protein Exportin-5 erkannt wird, das die pre-miRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert¹²¹. Im Zytoplasma wird die pre-miRNA durch das Protein Dicer, ebenfalls eine RNase III-Endonuklease und seinen katalytischen Partner TRBP (*trans-activator RNA-binding protein*) in eine ca. 22 Nukleotid lange microRNA-Duplexstruktur prozessiert. Im nächsten Schritt wird der pre-RISC (RNA-induced silencing complex) geformt, in dem die microRNA-Duplexstruktur auf ein Argonautenprotein geladen wird^{122,123}. Nach Entwindung der microRNA-Duplexstruktur verbleibt nur der *guided*-Strang, meist derjenige, der ein thermodynamisch instabileres 5'-Ende aufweist, im RISC, während der Gegenstrang, auch *passenger*-Strang genannt oder mit (*) gekennzeichnet, abgebaut wird¹²³.

Neben dem beschriebenen kanonischen Weg der microRNA-Biosynthese werden einige microRNAs auf dem nicht-kanonischen Weg synthetisiert. Dieser unterscheidet sich von dem kanonischen Weg darin, dass die pre-miRNA nicht durch den Mikroprozessor-Komplex generiert, sondern durch Spliceosomen erzeugt wird¹²⁴.

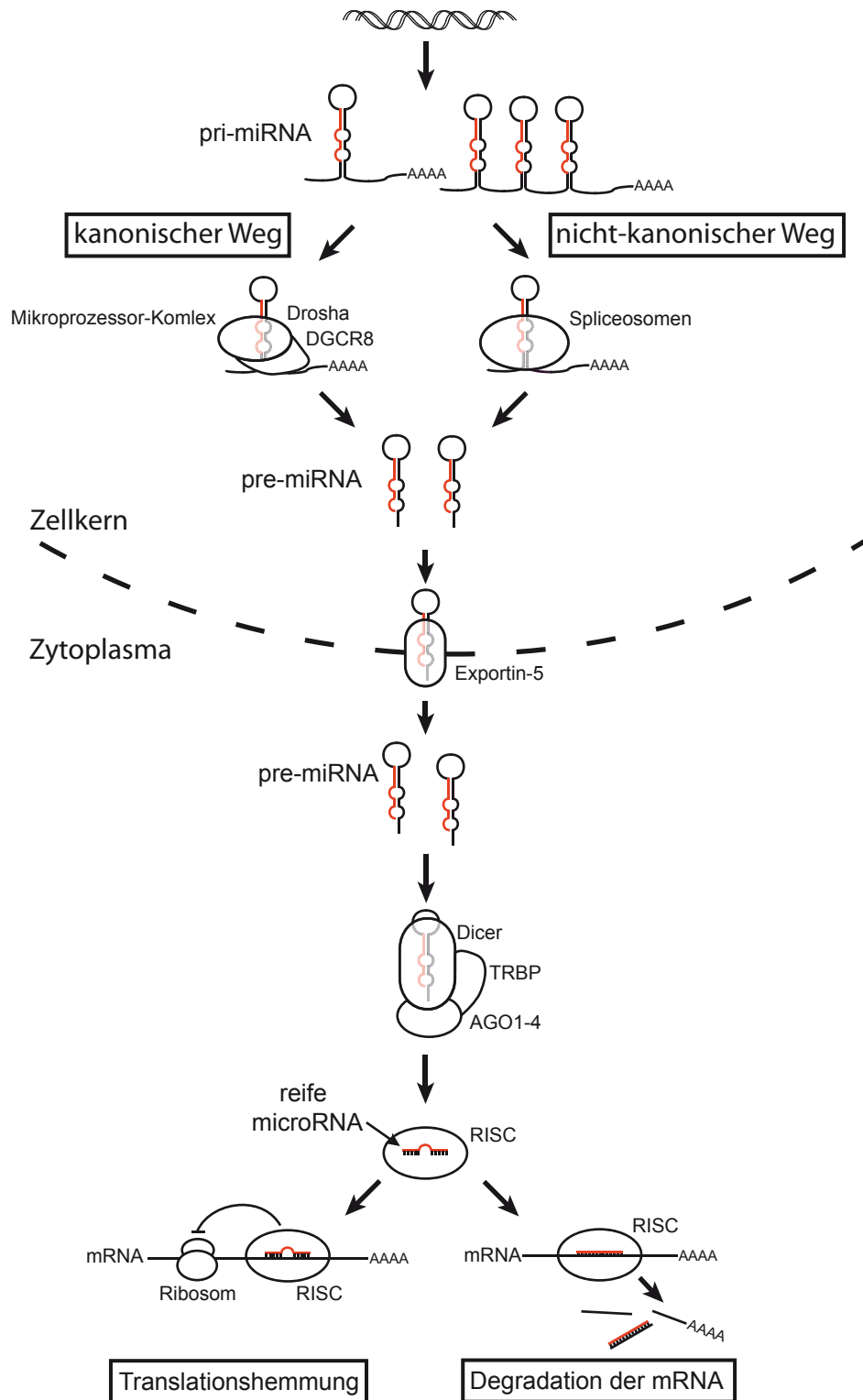


Abbildung 3 Biogenese und Reifung von microRNAs.

Dargestellt sind der kanonische und der nicht-kanonische Weg der Biogenese von microRNAs, sowie deren Mechanismen zur posttranskriptionellen Regulation von mRNAs. Modifiziert nach Li *et al.* 2014¹²⁵; DGCR8 = DiGeorge syndrome critical region gene 8; TRBP = trans-activator RNA-binding protein; AGO = Argonautenprotein; RISC = RNA-induced silencing complex.

1.9.2 Posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs

Nach der Degradation des *passanger*-Stranges leitet die im RISC verbliebene reife microRNA diesen zur 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA¹²⁶. Aufgrund der Kürze von microRNAs enthalten diese nur eine limitierte Sequenzinformation. Zusätzlich ist eine partielle Basenpaarung mit der Ziel-mRNA ausreichend für den Effekt der microRNA, so dass sehr viele unterschiedliche mRNAs von der selben microRNA reguliert werden können¹⁰⁹. Entscheidend für die Funktion einer microRNA ist eine vollständige Komplementarität zur Zielsequenz in ihrer *seed*-Region¹²⁷. Die *seed*-Region befindet sich am 5'-Ende einer reifen microRNA im Bereich von Nukleotid 2-8¹²³. Um die biologische Funktion bei Fehlbindungen in diesem Bereich aufrecht zu erhalten, müssen diese durch zusätzliche Paarungen am 3'-Ende der microRNA kompensiert werden¹²⁸. Der Mechanismus, über den eine microRNA seine Ziel-mRNA kontrolliert, scheint von dem Grad der Komplementarität abhängig zu sein. Als Hauptmechanismen der microRNAs sind die Degradation der Ziel-mRNA bei perfekter Komplementarität von *seed*-Region mit Zielsequenz und die Repression der Proteintranslation bei zentralem *mismatch* im Bereich von *seed*-Region und Zielsequenz beschrieben¹⁰⁹.

1.10 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Erforschung der molekularen Mechanismen zu leisten, welche den metabolischen Verbesserungen nach einer Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation zu Grunde liegen. Da eine Beteiligung des Gastrointestinaltraktes an diesen Mechanismen wahrscheinlich erscheint, steht im Zentrum dieser Arbeit die Frage, in welchem Maße ein RYGB zu molekularen Veränderungs- und Adaptationsprozessen im oberen menschlichen Dünndarm führt und über welche Mechanismen diese Prozesse reguliert werden könnten.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung standen intestinale Gewebebiopsien von zwölf RYGB-Patienten zur Verfügung, die aus dem Duodenum und dem Jejunum jeweils vor der Operation und aus dem Roux-Schenkel ein Jahr nach der RYGB-Operation entnommen wurden. Durch den Vergleich der genomweiten mRNA- und

microRNA-Expressionsprofile der verschiedenen Gewebeproben sollten folgende Teilaspekte untersucht werden:

1. Jejunum vs. Duodenum – Wie unterscheiden sich die physiologischen Expressionsprofile von Jejunum und Duodenum bei stark adipösen Patienten? Mit diesem Vergleich sollte die molekularbiologische Ausgangssituation im oberen Dünndarm vor einer RYGB-Operation beschrieben werden.
2. Roux-Schenkel vs. Duodenum – Führt eine RYGB-Operation durch die Verlagerung der anatomischen Position des Roux-Schenkels zu Adaptationsprozessen? In diesem Vergleich sollte analysiert werden, ob sich der Roux-Schenkel in seinen mRNA- und microRNA-Expressionsprofilen dem Duodenum anpasst.
3. Roux-Schenkel vs. Jejunum – Welche Adaptationsprozesse laufen auf Ebene der mRNA- und microRNA-Expressionsprofile im jejunalen Gewebe im ersten Jahr nach einer RYGB-Operation ab? Diesem Vergleich galt das Hauptinteresse, da hier Veränderungs- und Adaptationsprozesse besonders deutlich zu erkennen sein sollten.

Im Weiteren stellte sich die Frage welche Mechanismen die Veränderungs- und Adaptationsprozesse im oberen Dünndarm regulieren könnten. Um diesen Bereich näher zu beleuchten, wurde eine mögliche posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs untersucht. In diesem Zusammenhang wurde die Interaktion von microRNAs und *BCMO1*, welches für das Schlüsselenzym der Vitamin A Synthese kodiert, intensiv analysiert. Außerdem wurde der mögliche regulatorische Einfluss von Gallensäuren, bzw. der Wegfall des Gallensäurenkontaktes untersucht, welcher nach der RYGB-Operation im Roux-Schenkel auftritt.

Der besondere Nutzen dieser Arbeit liegt darin, dass für die Analysen Patientenproben zur Verfügung standen und so erstmals die Auswirkungen einer solchen bariatrischen Operation auf den menschlichen Dünndarm analysiert werden konnten. So können die Ergebnisse dieser Arbeit direkt als Grundlage für Folgestudien im humanen Gewebe dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle für diese Arbeit verwendeten Chemikalien stammen, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe), J. T. Baker (Deventer, Niederlande), MERCK KGaA (Darmstadt), Sigma Aldrich (St. Louis, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen). Die Plastikware wurde von den Firmen Eppendorf AG (Hamburg), SARSTEDT (Nümbrecht) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen.

2.2 Screening der mRNA- und microRNA-Expression

2.2.1 Kits, Chips, Arrays

Alle Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies (Darmstadt)
Agilent RNA 6000 Nano Chips	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
Ambion® WT Expression Kit	Life Technologies (Darmstadt)
GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization Kit	Affymetrix (Santa Clara, USA)
GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit	Affymetrix (Santa Clara, USA)
GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche (Basel, Schweiz)
TaqMan® Universal PCR Master Mix with AmpErase® UNG	Life Technologies (Darmstadt)
TaqMan® Array Human Endogenous Control Panel	Life Technologies (Darmstadt)
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies (Darmstadt)
Megaplex™ RT Primer, Pool A (v2.1) und Pool B (v.3.0)	Life Technologies (Darmstadt)
Megaplex™ PreAmp Primer. Pool A und Pool B	Life Technologies (Darmstadt)
TaqMan® PreAmp Master Mix (2×)	Life Technologies (Darmstadt)
TaqMan® Array MicroRNA Cards Pool A und B	Life Technologies (Darmstadt)
peqGOLD TriFast Reagenz	PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

2.2.2 Geräte

Gewebehomogenisator	Mikro-Dismembrator U	Satorius (Göttingen)
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Bioanalyzer	Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf AG (Hamburg)
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9700	Life Technologies (Darmstadt)
Hybridisierungssofen	GeneChip® Hybridization Oven 640	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Fluidics Station	GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Microarray-Scanner	7G GeneChip Scanner	Affymetrix (Santa Clara, USA)
Sealer	TaqMan® Array Micro Fluidic Card Sealer	Life Technologies (Darmstadt)
Realtime-PCR-Gerät	ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System	Life Technologies (Darmstadt)

2.2.3 Software

GeneChip operating software (GCOS)	Affymetrix (Santa Clara, USA)
R-Project	R Core Team (Österreich) ¹²⁹
Cluster 3.0	De Hoon <i>et al.</i> ¹³⁰
Java Treeview Version 1.1.3	Saldanha <i>et al.</i> ¹³¹
REVIGO	Supek <i>et al.</i> ¹³²
Cytoscape Version 3.1.1	Shannon <i>et al.</i> ¹³³
IBM SPSS Statistics 21.0	IBM (Ehningen)

2.2.4 Patientenrekrutierung und Probenpräparation

Im Rahmen einer klinischen Studie in der Abteilung für Chirurgie im Klinikum Südstadt in Rostock (Prof. Dr. med. Kaja Ludwig) wurden zwölf Patienten im Zeitraum von März 2007 bis Dezember 2009 rekrutiert. Die Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten Biopsien aus dem unteren Duodenum und dem Jejunum für Forschungszwecke entnommen werden durften. Das Studienprotokoll wurde zuvor von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald zustimmend bewertet.

Alle zwölf Patienten litten unter einer Adipositas Grad III ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$)³. Die weiteren Patientencharakteristika sind in Tabelle 3 aufgeführt. Aufgrund des starken Übergewichts wurde bei den Patienten eine laparoskopische proximale Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation (RYGB) durchgeführt, wie unter 1.5 beschrieben. Jedem Patienten wurden drei Gewebebiopsien aus dem Duodenum, Jejunum und Roux-Schenkel entnommen (siehe Abbildung 4). Eine Woche vor der RYGB-Operation wurde eine Biopsie aus der *Pars horizontalis*, dem unteren Teil des Duodenums, mittels Gastroduodenoskopie entnommen. Im Weiteren wird diese Biopsie als „Duodenum“ bezeichnet. Die zweite Biopsie wurde während der Operation mittels

Gastroskopie aus dem proximalen Teil des Roux-Schenkels ca. 10 cm unterhalb der gastrojejunalen Anastomose entnommen. Bei dem entnommenen Gewebe handelte es sich um jejunales Gewebe, welches dem Status des Jejunums vor der Operation entspricht, entsprechend wird diese Biopsie im Weiteren als „Jejunum“ bezeichnet. Die dritte Biopsie wurde ein Jahr nach der Operation ebenfalls aus dem proximalen Teil des Roux-Schenkels ca. 10 cm unterhalb der gastrojejunalen Anastomose entnommen und wird im Weiteren als „Roux-Schenkel“ bezeichnet. Alle Gewebeproben wurden sofort nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

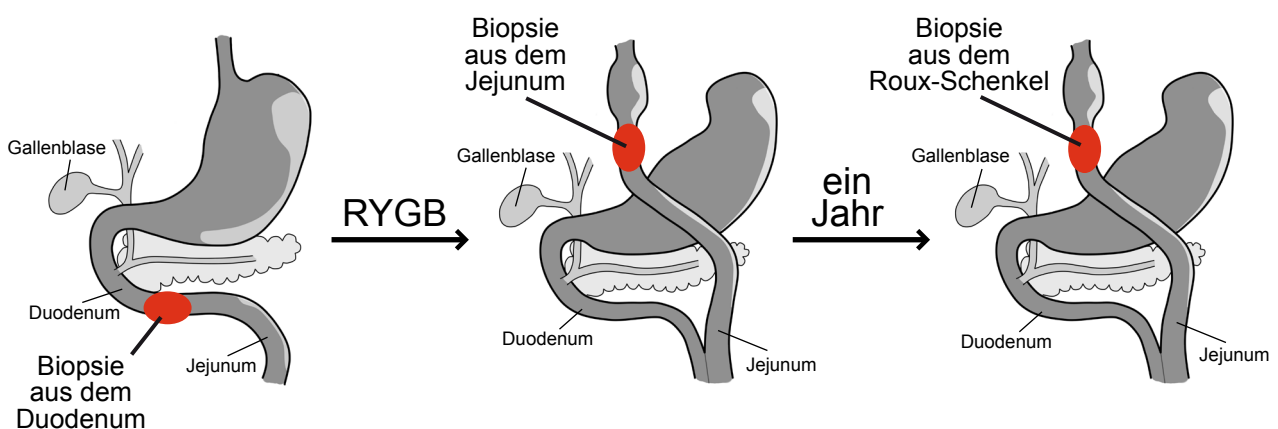


Abbildung 4 Positionen der intestinalen Probenentnahme.

Links ist die Position der Biopsie dargestellt, welche eine Woche vor der Operation aus der *Pars horizontalis* und somit dem Duodenum entnommen wurde. Die Biopsie aus dem Jejunum (in der Mitte dargestellt) wurde während der RYGB aus dem proximalen Teil des Roux-Schenkels ca. 10 cm unterhalb der gastro-jejunalen Anastomose genommen. Die Biopsie aus dem Roux-Schenkel (rechts dargestellt) wurde ein Jahr nach der Operation ebenfalls aus dem proximalen Teil der Roux-Schlinge ca. 10 cm unterhalb der gastro-jejunalen Anastomose entnommen. Die Positionen der Probenentnahmen sind rot gekennzeichnet.

2.2.5 Isolation von Gesamt-RNA inklusive der microRNA

Nach Zerkleinerung der Gewebebiopsien mit einem Gewebehomogenisator (1 min bei 2500 U/min), wurde die Gesamt-RNA inklusive microRNAs mit dem mirVana™ miRNA Isolation Kit isoliert. Hierfür wurde das Homogenisat in 600 μl Lysis-Puffer aufgenommen, der das chaotrope Salz Guanidinthiocyanat und β -Mercaptoethanol zur Denaturierung von Proteinen und Inaktivierung von RNasen enthielt. Die RNA wurde in der nachfolgenden Phenol-Chloroform-Extraktion von Proteinen und DNA abgetrennt. Die wässrige Phase, inklusive RNA, wurde dann auf eine Glasfaser-Säule gegeben und durch Zugabe von Ethanol über Wasserstoffbrückenbindungen

an die OH-Gruppen der Säule gebunden. Nach mehreren Waschschrinen konnte die gereinigte RNA mit 30 µl Elutionspuffer von der Säule eluiert werden.

Zur Isolation der Gesamt-RNA inklusive microRNAs aus den Zellpellets der Zellversuche wurde das peqGOLD TriFast Reagenz nach Herstellerangaben verwendet. Auch diese Isolation beruht auf dem Prinzip einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Allerdings wurden zur Aufreinigung keine Säulen verwendet. Stattdessen wurde die RNA durch Zugabe von Isopropanol gefällt. Danach wurde das RNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, um noch vorhandene Verunreinigungen durch Phenol oder Salze zu entfernen und im letzten Schritt in Wasser resuspendiert.

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Integrität und Konzentration der aus den Gewebeproben isolierten Gesamt-RNA wurde auf einem Agilent 2100 Bioanalyzer mit Agilent RNA 6000 Nano Chips gemessen. Die Technik basiert auf dem Prinzip der Gelelektrophorese. Pro Chip werden je 1 µl von maximal elf RNA-Proben und einem Marker parallel im elektrischen Feld entsprechend ihrer Fragmentgrößen durch den Molekularsiebeffekt des Polymers aufgetrennt. Die RNA-Moleküle interkalieren mit dem im Gel enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff, so dass die RNA-Fragmente und deren Laufzeiten mittels eines Fluoreszenzdetektors registriert werden können. Der Bioanalyzer generiert aus diesen Daten ein der Gelelektrophorese ähnliches Bild und ein Elektropherogramm. Zur Berechnung der RNA-Konzentration wird das Areal unter der Kurve des Markers mit dem Areal unter der Kurve einer Probe verglichen.

Zur Konzentrationsbestimmung derjenigen RNA-Proben, die in den Zellversuchen generierten wurden und der Probanden-DNA, die als Matrize der Klonierung diente, wurde das Biophotometer 6131 verwendet. Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt durch die Messung der optischen Dichte (OD) der jeweiligen Lösung. Die Basen der Nukleinsäuren sind Chromophore und absorbieren ultraviolettes Licht mit einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Die Nukleinsäure-Lösungen werden mit einer Wellenlänge von 260 nm angeregt und anschließend wird die Verminderung des eingestrahnten Lichtes nach Passieren der Lösung gemessen. Über das Lambert-Beersche Gesetz wird dann die Konzentration der Nukleinsäure-Lösung berechnet. Der Quotient aus OD_{260} und

OD₂₈₀ gibt Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäuren, wobei der Wert für eine reine DNA-Lösung bei 1,8 und für eine reine RNA-Lösung bei 2 liegen sollte.

2.2.7 Untersuchung der genomweiten mRNA-Expression

Mittels der Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays wurde eine genomweite Genexpressionsanalyse aller 36 Gewebeproben durchgeführt, die den zwölf Patienten im Verlauf der Studie entnommen wurden. Mit diesen Arrays können die Expressionswerte von 28869 Transkripten parallel bestimmt werden. Jedes Gen ist im Durchschnitt durch 26 Oligonukleotid-Sonden (25-mer) auf einem Array repräsentiert, welche auch als *probe sets* bezeichnet werden.

2.2.7.1 Durchführung des Microarray-Experiments

Nach der Qualitätskontrolle (2.2.6) wurden 100 ng der Gesamt-RNA von jeder Probe eingesetzt und auf den GeneChips nach Herstellerangaben vermessen. Hierfür wurde die RNA zunächst unter Verwendung des WT Expression Kits mit T7-Oligo(dT) Promotor Primern in Einzelstrang-cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte, wie auch alle weiteren PCR Reaktionen, ausgenommen der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR), auf einem GeneAmp PCR System 9700. Im nächsten Schritt wurde bei gleichzeitiger Degradation der RNA der Zweitstrang der DNA synthetisiert. Durch *in-vitro* Transkription mit einer T7 RNA-Polymerase wurde nun eine *antisense* cRNA transkribiert. Nach einer Aufreinigung und dem Überprüfen der Konzentration sowie der Größenverteilung, erfolgte bei der *sense-strand* cDNA Synthese der Einbau von dUTP. Mit Hilfe des GeneChip® WT Terminal Labeling and Hybridization Kits wurde die cDNA zunächst fragmentiert, wobei die Strangbrüche an den Stellen initiiert wurden, an denen sich das dUTP befand. Anschließend wurden die Fragmente mit Biotin markiert. Die Hybridisierung, das Waschen und das Färben der GeneChips erfolgte mit dem GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit. Die biotinylierte *sense-strand* cDNA, die nach der Hybridisierung an die *probe sets* des Arrays gebunden war, wurde mit R-Phycoerythrin-Streptavidin inkubiert, wobei das R-Phycoerythrin-Streptavidin selektiv an Biotin bindet. Anschließend wurde das gebundene Phycoerythrin durch Laserstrahlen angeregt und das resultierende Fluoreszenzsignal mittels des Affymetrix 7G GeneChip Scanners detektiert.

2.2.7.2 Auswertung der Microarray-Daten

Für eine erste Qualitätskontrolle und die Generierung der CEL files, die die Rohdaten der Microarray-Messung enthalten, wurde die GeneChip operating software (GCOS) von Affymetrix verwendet. Die weitere Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software R (Version 3.1.0), einer Programmiersprache zur statistischen Datenauswertung und deren graphischer Darstellung¹²⁹.

Zunächst wurden die Rohdaten normalisiert, um die störende Varianz der Messwerte, die keinen biologischen Ursprung hat, zu minimieren. Diese nicht biologische Varianz kann z.B. durch Unterschiede in der Hybridisierungseffizienz verursacht werden. Die Microarray-Daten der vorliegenden Studie wurden mittels der *robust multi-array average* (RMA) Methode normalisiert. Die RMA-Methode setzt sich aus drei Schritten zusammen: a) Korrektur des Hintergrundrauschens je Array, b) Quantilnormalisierung, durch die die Expressionsverteilung der Arrays aneinander angeglichen wird und c) Zusammenfassung der Proben zu *Probesets* über Medienglättung.

In die weitere Datenanalyse wurden nur diejenigen Transkripte eingeschlossen, die nach der Normalisierung in mindestens 80% der Proben einen Wert aufwiesen. Im nächsten Schritt wurden die Daten nach Genen untersucht, die zwischen den verschiedenen Geweben (Jejunum vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Duodenum und Roux-Schenkel vs. Jejunum) eine differenzielle Expression aufwiesen. Für jedes Transkript wurde der *fold change* berechnet, der auf dem Verhältnis der beiden Mediane der zu vergleichenden Gruppen (Jejunum vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Jejunum) basierte. Zusätzlich wurde die *false discovery rate* (FDR) des *fold changes* mittels der Westfall & Young Permutation mit $k = 10000$ Permutationen abgeschätzt¹³⁴. Ziel der Berechnung der FDR war es abzuschätzen, wie groß die Wahrscheinlichkeit ist, dass der ermittelte *fold change* nur durch Zufall entstanden ist. Desweiteren wurden die Rangsummendifferenzen der mRNAs zwischen den zu vergleichenden Gruppen berechnet. Alle mRNAs, die in einem Vergleich eine Rangsummendifferenz aufwiesen, die mindestens halb so groß wie die größte in diesem Vergleich berechnete Rangsummendifferenz war, wurden als mindestens 50% distinkt exprimiert gekennzeichnet. Die folgenden Kriterien musste eine mRNA erfüllen, um als differenziell exprimiert zwischen zwei Gruppen

zu gelten: sie musste entweder einen *fold change* $< -1,5$ oder $> 1,5$ aufweisen. Zusätzlich musste sie eine FDR $< 5\%$ zeigen und mindestens 50% distinkt exprimiert sein. Alle mRNAs, die diese Kriterien erfüllten, wurden in die weiteren Analysen eingeschlossen.

Dieser Teil der Datenanalyse wurde von Dr. rer. nat. Robert Häsler (Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel) durchgeführt.

2.2.7.3 Hauptkomponentenanalyse differenziell exprimierter mRNAs

Um die große Anzahl an differenziell exprimierten mRNAs überschaubarer zu machen und Hinweise zu erlangen, ob bestimmte Profile bzw. Muster in den Expressionsdaten zu erkennen sind, bieten sich Methoden wie die Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis* (PCA)) oder die unüberwachte hierarchische Clusteranalyse an. Ziel dieser Analysen ist es, Gene oder Proben, die eine ähnliche Expression aufweisen, zusammen zu gruppieren, bzw. diejenigen mit unterschiedlicher Expression in unterschiedliche Gruppen einzuteilen. Am Ende der PCA steht eine Dimensionsreduktion, die es erleichtert, Zusammenhänge zwischen Variablen zu erkennen und so die Interpretation der Daten vereinfacht. Dementsprechend liegt einer PCA die Annahme zu Grunde, dass nur derjenige Teil der Varianz für eine sinnvolle Interpretation wichtig ist, der sich auf die wichtigsten Hauptkomponenten projizieren lässt. Im Verlauf einer PCA werden die Variablen durch lineare Kombination zu den Hauptkomponenten zusammengefasst. Die Darstellung der zu charakterisierenden Proben (hier der Gewebeproben) erfolgt in einem Score-Plot, welcher die lineare Projektion der ursprünglichen Datenmatrix auf den niedrig dimensionierten Raum zeigt. Die ersten zwei Hauptkomponenten können in einer zweidimensionalen Darstellung visualisiert werden, wobei die erste Hauptkomponente den größten Teil der Varianz der Variablen erklärt und die zweite den zweitgrößten. Liegen zwei Punkte bzw. Proben nahe beieinander, so zeigen sie ähnliche Expressionsmuster, je weiter sie auseinander liegen, umso stärker unterscheiden sich diese. In die PCA wurden nur diejenigen Transkripte einbezogen, die nach den unter 2.2.7.2 aufgeführten Kriterien als differenziell exprimiert galten. Die PCA basiert auf den durch *z-Transformation* ¹³⁵

standardisierten Expressionswerten. Für die Berechnung und Visualisierung der PCA wurde die Funktion `prcomp` der Software R ¹²⁹ verwendet.

2.2.7.4 Hierarchische Clusteranalyse differenziell exprimierter mRNAs

Die unüberwachte hierarchische Clusteranalyse stellt ein alternatives Verfahren zur PCA dar, verfolgt aber im Grundatz das gleiche Ziel. Für einen besseren Überblick über die Expressionsdaten sollen die Objekte (Gene, Proben) so in Gruppen zusammengefasst werden, dass die Elemente in einer Gruppe untereinander möglichst ähnlich und zwischen zwei Gruppen möglichst unähnlich sind. Für diese Analyse wurde die Software Cluster 3.0 verwendet ¹³⁰. Für die agglomerative Berechnung des Clusters wurde als Algorithmus die *average linkage* Methode verwendet. Hierbei bildet zunächst jedes Objekt einen Cluster und wird dann mit anderen schrittweise zu immer größeren Clustern zusammengefasst. Als Maß für die Ähnlichkeit wurde die Rangkorrelation nach Spearman verwendet. Die Clusteranalyse basierte ebenfalls auf den mittels z-Transformation ¹³⁵ standardisierten Expressionswerten derjenigen mRNAs, die nach den unter 2.2.7.2 aufgeführten Kriterien als differenziell exprimiert galten. Zur Visualisierung der Ergebnisse der Clusteranalyse wurde die Software Java Treeview Version 1.1.3 verwendet ¹³¹. Es wurden ein Dendrogramm für die Gewebeproben sowie eine *heatmap* erstellt, in der heraufregulierte mRNAs gelb, nicht regulierte mRNAs schwarz und herunterregulierte blau dargestellt sind.

2.2.7.5 Überrepräsentationsanalyse von *Gene Ontology* (GO)-Termen

Bei den *Gene Ontology* (GO)-Termen handelt es sich um Ontologien, die im Rahmen des Gene Ontology Consortiums entwickelt wurden ¹³⁶. Sie beschreiben die Eigenschaften von Genen anhand von molekularen Funktionen, Beteiligung an biologischen Prozessen und der zellulären Lokalisation. Die GO-Terme werden in die folgenden drei Ontologien eingeteilt: „Biologische Prozesse“, „Molekulare Funktion“ und „Zelluläre Komponente“, die jeweils in verschiedene Ebenen bzw. Levels untergliedert sind. GO-Terme zeigen eine lockere Hierarchie, in der die „Kinder“ Terme spezifischer sind als ihre „Eltern“ Terme, allerdings kann ein Term mehrere „Eltern“ Terme besitzen. In dieser Arbeit werden die englischen Termmamen

verwendet, da es keine offizielle deutsche Übersetzung gibt, und diese den GO-Identifikatoren eindeutig zugeordnet werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Genlisten, die aus der genomweiten mRNA-Expressionsanalyse resultierten, bezüglich der Ontologie „Biologische Prozesse“ des Levels 4 analysiert. Die Terme des Levels 4 sind ausreichend spezifisch, um einen Überblick über die verschiedenen involvierten biologischen Prozesse zu erlangen. Die Überrepräsentationsanalysen wurden mit dem online verfügbaren Programm ConsensusPathDB (www.consensuspathdb.org)^{137,138}, das vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt wird, durchgeführt. Als Eingabe für diese Analysen wurden diejenigen mRNAs verwendet, die in den drei Vergleichen (Jejunum vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Jejunum) jeweils eine differenzielle Expression aufwiesen (Anhang, Tabelle 1-3). In dieser Art der Analyse wird mittels hypergeometrischer Tests geprüft, ob bestimmte GO-Terme in einer Teilmenge von Genen, hier diejenigen, die differenziell exprimierten überrepräsentiert sind, also häufiger vorkommen als statistisch zu erwarten wäre, im Vergleich zum kompletten Transkriptom. Die Analyse liefert so Hinweise, an welchen zellulären Prozessen die untersuchten Kandidatengene beteiligt sind. Diejenigen GO-Terme, die einen p-Wert $< 0,05$ und eine FDR $< 1\%$ aufwiesen, wurden als relevant erachtet.

Um die erhaltenen Listen an GO-Termen besser zu veranschaulichen, wurde die Software REVIGO genutzt (www.revigo.irb.hr). REVIGO fasst lange GO-Term-Listen zusammen, indem redundante Terme entfernt werden¹³². Die Terme können hier in einem auf semantischer Ähnlichkeit basierenden Scatterplot dargestellt werden, welcher die Untergliederungen und die semantischen Beziehungen in den Daten wiedergibt. Jeder GO-Term stellt einen Knoten in dem Graphen dar, und 3% der stärksten paarweise Ähnlichkeiten der GO-Terme wurden als Kanten gekennzeichnet. Die erhaltenen Netzwerkdaten wurden mittels der Software Cytoscape Version 3.1.1 visualisiert.

2.2.7.6 Quantitative Realtime PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Realtime Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine Methode, bei der während der PCR die Zunahme des PCR-Produktes über einen

Fluoreszenzfarbstoff in Echtzeit detektiert wird. Die in dieser Arbeit angewendete qRT-PCR nach dem TaqMan® Prinzip nutzt den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*) aus¹³⁹. Für die Reaktion wird ein Gemisch aus Vorwärts-, Rückwärtsprimer und einer Sonde verwendet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt ist. Die Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff gekoppelt und am 3'-Ende an einen nicht fluoreszierenden *Quencher* gebunden. Sobald die Polymerase im Elongationsschritt der PCR auf die Sonde trifft, spaltet sie den Reporter durch ihre Exonuklease-Aktivität ab, vergrößert so den Abstand zwischen Reporter und *Quencher* und führt zur Emission eines Fluoreszenzsignals. Die Signalstärke steigt an, je mehr DNA synthetisiert wird. Zur Quantifizierung wird der Ct-Wert verwendet. Dieser gibt die Zykluszahl an, bei der das Fluoreszenzsignal sich erstmals deutlich vom Hintergrund abhebt und somit einen Schwellwert (*threshold*) überschreitet. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zu der Ausgangsmenge der cDNA.

Zur relativen Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode¹⁴⁰ angewendet. Dabei wird die Expression des Zielgens relativ zu einer endogenen Kontrolle (siehe 2.2.7.8) bestimmt. Im ersten Schritt wird der Ct-Wert der endogenen Kontrolle von dem Ct-Wert des untersuchten Gens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{endogene Kontrolle}}$). Nach diesem Normalisierungsschritt wird vom ΔCt -Wert der experimentell behandelten Probe der ΔCt -Wert der Kontrollprobe abgezogen ($\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{behandelte Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kontrollprobe}}$). Der relative Expressionsunterschied zwischen einer behandelten Probe und der Kontrollprobe ergibt sich über $X = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.2.7.7 Reverse Transkription der mRNA

Da die RNA kein direktes Template für die qRT-PCR darstellt, wurden die einzelnen Proben zunächst mittels reverser Transkription mit dem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit nach Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. Für die Reaktion wurde 1 μg RNA mit zufälligen Hexamerprimern (*random hexamer primer*) und der Transcriptor reverser Transkriptase in Kombination mit einer Korrekturlese-Polymerase gemischt und für 30 min bei 55°C inkubiert. Bei der reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zusätzlich zur DNA-abhängigen DNA-Polymerase, eine DNA-entwindende und eine RNase Aktivität besitzt. Durch diese Eigenschaften wird der RNA-Strang der

Hybridhelix während der Synthese abgebaut und durch den komplementären DNA-Strang ersetzt. Die *random hexamer primer* wurden verwendet, da sie zufällig mit der mRNA hybridisieren und so sicherstellen, dass alle Bereiche der mRNA in der cDNA vertreten sind.

2.2.7.8 Ermittlung einer geeigneten endogenen Kontrolle für die qRT-PCR

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete qRT-PCR beruht auf dem unter 2.2.7.6 beschriebenen Prinzip der relativen Quantifizierung. Bei der relativen Quantifizierung werden keine absoluten Mengen an cDNA gemessen, die bei der PCR-Reaktion entstehen. Stattdessen werden die gemessenen Mengen des PCR-Produktes des Zielgens mit denen eines Referenzgens ins Verhältnis gesetzt. Als Referenzgen, das auch als endogene Kontrolle bezeichnet wird, eignen sich Gene, die ubiquitär und unabhängig von Zell- oder Gewebetyp oder äußeren Einflüssen exprimiert werden. Für jeden experimentellen Ansatz müssen geeignete endogene Kontrollen identifiziert werden. Für die Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR musste somit eine geeignete endogene Kontrolle gefunden werden, die über alle drei Gewebearten eine gleichmäßige Expression aufwies. Aus diesem Grund wurde die Expression von 16 verschiedenen Genen, die als potentielle endogene Kontrollen in Frage kommen konnten, in 16 Gewebeproben (sechs aus dem Duodenum und jeweils fünf aus Jejunum und Roux-Schenkel) getestet. Hierfür wurde das TaqMan® Array Human Endogenous Control Panel verwendet. Die dafür verwendeten TaqMan® Array Micro Fluidic Cards (TLDA) bestehen aus 384 Reaktionsgefäßen, die mit TaqMan® Gene Expression Assays für die 16 potentiellen endogenen Kontrollen vorbeladen sind (siehe Tabelle 1). Pro Probe und Reservoir wurden 200 ng cDNA mit Nuklease-freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mit 50 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix with AmpErase® UNG gemischt. Dieser Proben-spezifische PCR Mix wurde in je ein Reservoir der TLDA gefüllt, so dass pro Array acht Proben parallel in Triplikaten vermessen werden konnten. Nach dem Befüllen wurde das Array 2x 1 min bei 1200 rpm in einer Heraeus Multifuge 3 S-R zentrifugiert und mit dem TaqMan® Array Micro Fluidic Card Sealer verschlossen. Danach wurde das Array unter Standard-Bedingungen (2 min bei 50°C, 10 min bei 94,5°C, 40 Zyklen: 30 sec 97°C und 1 min 59,7°C) auf dem ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System vermessen. Um zu überprüfen, wie gleichmäßig die

gewählten mRNAs über alle 16 gemessenen Proben exprimiert sind, wurde jeweils der Median und der Interquartilabstand berechnet.

Tabelle 1 TaqMan® Assays des TaqMan® Array Human Endogenous Control Panels

Gensymbol^a	Genname^b	TaqMan® Assay
<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Hs99999905_m1
<i>18S</i>	<i>eukaryotic 18S rRNA</i>	Hs99999901_s1
<i>ACTB</i>	<i>beta actin</i>	Hs99999903_m1
<i>B2M</i>	<i>beta-2-microglobulin</i>	Hs99999907_m1
<i>GUSB</i>	<i>beta-glucuronidase</i>	Hs99999908_m1
<i>HMBS</i>	<i>hydroxymethylbilane synthase</i>	Hs00609297_m1
<i>HPRT1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	Hs99999909_m1
<i>IPO8</i>	<i>importin 8</i>	Hs00183533_m1
<i>PGK1</i>	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>	Hs99999906_m1
<i>POLR2A</i>	<i>polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa</i>	Hs00172187_m1
<i>PPIA</i>	<i>peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i>	Hs99999904_m1
<i>RPLP0</i>	<i>ribosomal protein, large, P0</i>	Hs99999902_m1
<i>TBP</i>	<i>TATA-box binding protein</i>	Hs99999910_m1
<i>TFRC</i>	<i>transferrin receptor</i>	Hs99999911_m1
<i>UBC</i>	<i>ubiquitin C</i>	Hs00824723_m1
<i>YWHAZ</i>	<i>tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta</i>	Hs00237047_m1

^aoffizielle Gensymbole, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^boffizielle Gennamen, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

2.2.7.9 Validierung ausgewählter Gene mittels qRT-PCR

Ausgewählte Gene, die in der Microarray-Analyse der Dünndarmproben differenziell exprimiert waren, wurden mittels qRT-PCR verifiziert. Zusätzlich wurde die Expression einiger Gene mittels qRT-PCR überprüft, die in der Mikroarray-Analyse zwar keine differenzielle Regulation aufwiesen, aber in einem sehr nahen funktionellen Zusammenhang mit den differenziell regulierten Genen stehen. Insgesamt wurden für diese Bestätigung 43 Kandidatengene und 18S als endogene Kontrolle ausgewählt. Die TaqMan® Gene Expression Assays für die ausgewählten Gene (siehe Tabelle 2) wurden von Life Technologies als *custom made array* auf TaqMan® Array Micro Fluidic Cards (TLDA) vorbeladen. Die Probenvorbereitung und Vermessung ausgehend von 200 ng cDNA pro Probe und Reservoir erfolgten wie unter 2.2.7.8 beschrieben. Zur Auswertung der Daten wurde die unter 2.2.7.6

beschriebene $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode für eine relative Quantifizierung angewendet. Der p-Wert wurde mittels des Wilcoxon-Rang-Tests für gepaarte Proben berechnet und mit Hilfe der Benjamini-Hochberg-Prozedur für multiples Testen adjustiert ¹⁴¹.

Tabelle 2 TaqMan® Assays für die ausgewählten Kandidatengene

Gensymbol^a	Genname^b	TaqMan® Assay
<i>ABCA1</i>	<i>ATP-binding cassette subfamily A member 1</i>	Hs01059118_m1
<i>ABCB1</i>	<i>ATP-binding cassette subfamily B member 1</i>	Hs01067802_m1
<i>ABCG1</i>	<i>ATP-binding cassette subfamily G member 1</i>	Hs00245154_m1
<i>ABCG5</i>	<i>ATP-binding cassette subfamily G member 5</i>	Hs00223686_m1
<i>ABCG8</i>	<i>ATP-binding cassette subfamily G member 8</i>	Hs00223690_m1
<i>ACAT1</i>	<i>acetyl-CoA acetyltransferase 1</i>	Hs00608002_m1
<i>ACAT2</i>	<i>acetyl-CoA acetyltransferase 2</i>	Hs00255067_m1
<i>APOA1</i>	<i>apolipoprotein A-I</i>	Hs00163641_m1
<i>APOC2</i>	<i>apolipoprotein C-II</i>	Hs03037356_m1
<i>BCMO1</i>	<i>β-carotene oxygenase 1</i>	Hs00363176_m1
<i>CUBN</i>	<i>cubilin</i>	Hs00153607_m1
<i>CYP51A1</i>	<i>cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1</i>	Hs01567880_g1
<i>CYP7A1</i>	<i>cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1</i>	Hs00167982_m1
<i>DGAT2</i>	<i>diacylglycerol O-acyltransferase 2</i>	Hs01045913_m1
<i>DHCR24</i>	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>	Hs00207388_m1
<i>DHCR7</i>	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>	Hs01023087_m1
<i>ERN2</i>	<i>endoplasmic reticulum to nucleus signaling 2</i>	Hs00414750_m1
<i>GCG</i>	<i>glucagon</i>	Hs01031536_m1
<i>HMGCR</i>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase</i>	Hs00168352_m1
<i>HMGCS2</i>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)</i>	Hs00985427_m1
<i>INSIG1</i>	<i>insulin induced gene 1</i>	Hs01650977_g1
<i>LDLR</i>	<i>low density lipoprotein receptor</i>	Hs00181192_m1
<i>LRAT</i>	<i>lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol O-acyltransferase)</i>	Hs00428109_m1
<i>MTTP</i>	<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>	Hs00165177_m1
<i>NPC1L1</i>	<i>NPC1-like 1</i>	Hs03037374_m1
<i>NPY2R</i>	<i>neuropeptide Y receptor Y2</i>	Hs01921296_s1
<i>NR0B2</i>	<i>nuclear receptor subfamily 0 group B member 2</i>	Hs00222677_m1
<i>NR1H3</i>	<i>nuclear receptor subfamily 1 group H member 3</i>	Hs00172885_m1
<i>PCK1</i>	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)</i>	Hs00159918_m1
<i>PDK4</i>	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4</i>	Hs01037712_m1
<i>PPARA</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>	Hs00947537_m1
<i>PPARG</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>	Hs01115513_m1
<i>PYY</i>	<i>peptide YY</i>	Hs00373890_g1
<i>RDH11</i>	<i>retinol dehydrogenase 11</i>	Hs00211283_m1
<i>RXRA</i>	<i>retinoid X receptor, alpha</i>	Hs01067640_m1
<i>SC5DL</i>	<i>sterol-C5-desaturase</i>	Hs00999007_m1

<i>SCARB1</i>	<i>scavenger receptor class B, member 1</i>	Hs00969821_m1
<i>SLC10A2</i>	<i>solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2</i>	Hs01001557_m1
<i>SLC23A1</i>	<i>solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1</i>	Hs00195277_m1
<i>SLC30A4</i>	<i>solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4</i>	Hs00203308_m1
<i>SLC46A1</i>	<i>solute carrier family 46 (folate transporter), member 1</i>	Hs00611081_m1
<i>SREBF2</i>	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 2</i>	Hs01081784_m1
<i>STARD4</i>	<i>StAR related lipid transfer domain containing 4</i>	Hs00287823_m1

^aoffizielle Gensymbole, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^boffizielle Gennamen, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

Grau markiert sind diejenigen Gene, die in der Mikroarray Analyse keine differenzielle Regulation aufwiesen

2.2.8 Untersuchung der genomweiten microRNA-Expression

Zur Ermittlung der genomweiten microRNA-Expressionsprofile wurde die microRNA, die aus den Dünndarmbiopsien von elf Patienten gewonnen wurde, mittels TaqMan® Array MicroRNA Cards Pool A und B vermessen. Mit Hilfe dieser Arrays können die Expressionsmuster von 754 microRNAs pro Probe parallel bestimmt werden. Aufgrund der begrenzten Menge an Gesamt-RNA, die aus den einzelnen Biopsien isoliert werden konnte, stand für die Analyse der microRNA-Expression nur noch die RNA aus 33 Proben zur Verfügung statt der aus 36 Proben, die für die Vermessung der mRNA-Expression verwendet wurden.

2.2.8.1 Reverse Transkription der microRNA

Zunächst wurden die in 2.2.5 mit isolierten microRNAs mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit und den Megaplex™ RT Primers für Pool A (v.2.1) und für Pool B (v.3.0) in Einzelstrang cDNA umgeschrieben. Von jeder Probe wurden 350 ng Gesamt-RNA eingesetzt und nach Herstellerangabe in einem Gesamtvolumen von 7,5 µl umgeschrieben. Die Megaplex™ RT Primer weisen an ihrem 5'-Ende eine universelle haarnadelartige (*stem-loop*) Struktur auf und binden an ihrem 3'-Ende an die revers zu transkribierende microRNA, um als Ausgangspunkt für die cDNA Synthese zu dienen. Diese Struktur erhöht die Spezifität der Primer und verhindert zusätzlich das *Annealing* von pre- und pri-microRNAs ¹⁴².

2.2.8.2 Präamplifikation der cDNA

Nach der reversen Transkription wurde eine Präamplifikation nach Herstellerangaben mit 12 Zyklen durchgeführt, um die Sensitivität der eigentlichen qRT-PCR zu erhöhen. 2,5 µl des Produktes der reversen Transkription (cDNA) (2.2.8.1) wurden mit 22,5 µl PreAmp Reaktionsmix, bestehend aus Megaplex™ PreAmp Primern Pool A oder B, TaqMan® PreAmp Master Mix (2×) und Nuklease-freiem Wasser gemischt. Die Megaplex™ PreAmp Primer bestehen aus jeweils einem microRNA-spezifischen Vorwärts-Primer und einem universellen Rückwärts-Primer. Das Produkt der Präamplifikation wurde 1:4 mit 0,1× TE-Puffer pH 8,0 verdünnt.

2.2.8.3 Durchführung der microRNA-Expressionsanalyse

Zum Befüllen einer TaqMan® Array MicroRNA Card Pool A oder B wurde entsprechend entweder 9 µl PreAmp Produkt Pool A oder Pool B mit 450 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix with AmpErase® UNG und 444 µl Nuklease-freiem Wasser gemischt. Nach Füllung aller Reservoirs einer TLDA mit diesem PCR-Mix wurden die Arrays 2x 1 min bei 1200 rpm zentrifugiert und mit dem Micro Fluidic Card Sealer verschlossen. Danach wurden die Arrays unter Standard-Bedingungen (2 min bei 50°C, 10 min bei 94,5°C; 40 Zyklen: 30 sec 97°C und 1 min 59,7°C) auf dem ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System vermessen.

2.2.8.4 Datenanalyse der genomweiten microRNA-Expressionsmuster

Alle microRNAs, deren Ct-Werte in mindestens einer Probe über 32 lagen, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die relative Quantifizierung wurde nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (siehe 2.2.7.6) durchgeführt. Zur Normalisierung der Ct-Werte der microRNAs wurde entweder für Pool A die MammU6 oder für Pool B die U6 snRNA als endogene Kontrolle verwendet, wobei beide Namen dieselbe endogene Kontrolle bezeichnen. Der *fold change* jeder microRNA wurde basierend auf dem Verhältnis der beiden Mediane der zu vergleichenden Gruppen (Jejunum vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Jejunum) zueinander berechnet, entsprechend den mRNAs. Dann wurde getestet, ob microRNAs zwischen den verschiedenen Gewebearten differenziell exprimiert waren. Hierfür wurden die p-Werte mit Hilfe des Wilcoxon-Rang-Testes für gepaarte Proben berechnet. Da für

jede microRNA ein einzelner p-Wert berechnet werden musste, war die Anzahl der durchgeführten Tests sehr hoch, womit die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse stieg. Um dieses Problem des multiplen Testens zu lösen, bietet es sich an, die *false discovery rate* (FDR, der Anteil an falsch positiv detektierten microRNAs unter allen differenziell exprimierten microRNAs) zu kontrollieren. Hierfür wurden alle p-Werte mittels der Benjamini-Hochberg-Prozedur adjustiert¹⁴¹. Diejenigen microRNAs, die nach Korrektur einen p-Wert < 0,05 aufwiesen, wurden als statistisch signifikant und damit als relevant erachtet. Diese Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Software R (Version 3.1.0)¹²⁹.

2.2.8.5 Hauptkomponentenanalyse ausgewählter microRNAs

Um den Datensatz der microRNA-Expressionsdaten zu strukturieren und zu veranschaulichen, wurde eine PCA wie unter 2.2.7.3 beschrieben, basierend auf den mittels z-Transformation¹³⁵ standardisierten microRNA-Expressionswerte, durchgeführt. In die Analyse wurden nur diejenigen microRNAs einbezogen, die für mindestens einen Vergleich nach Adjustierung einen p-Wert < 0,05 aufwiesen.

2.2.8.6 Validierung ausgewählter microRNAs mittels individueller TaqMan® Assays

Die Expression von drei ausgewählten microRNAs (hsa-miR-130a, hsa-miR-301a, hsa-miR-454) wurden mittels individueller TaqMan® MicroRNA Expression Assays verifiziert und auf U6 snRNA als endogene Kontrolle bezogen. Aufgrund der niedrigen isolierten Gesamt-RNA-Menge standen für diese Verifizierung nur noch die Proben von insgesamt sieben der ursprünglich zwölf Patienten zur Verfügung. Die folgenden Assays wurden verwendet: hsa-miR-130a (000454), hsa-miR-301a (000528), hsa-miR-454 (002323) und U6 snRNA (001973). Die reverse Transkription wurde wie unter 2.2.8.1 beschrieben mit 350 ng der unter 2.2.5 isolierten Gesamt-RNA und einem individuell angefertigten Primer Mix, bestehend aus den RT Primern der drei zu messenden microRNAs sowie der U6 snRNA, durchgeführt. Das Produkt der reversen Transkription wurde dann, wie unter 2.2.8.2 beschrieben, mit einem individuell angefertigten Primer Mix, bestehend aus den TaqMan® Assays der drei zu messenden microRNAs sowie der U6 snRNA, präamplifiziert. Im nächsten Schritt

wurden die Proben auf dem 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) unter Standardbedingungen (2.2.8.3) vermessen.

2.3 Identifizierung potentieller microRNA-mRNA-Interaktionen

Nachdem in zwei Vergleichen (Jejunum vs. Duodenum und Roux-Schenkel vs. Jejunum), sowohl differenziell exprimierte mRNAs als auch microRNAs identifiziert wurden, stellte sich die Frage, ob zwischen diesen potentielle Interaktionen vorliegen, die auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen hindeuten. Zunächst wurden Korrelationsanalysen durchgeführt, da eine signifikant inverse Korrelation zwischen mRNA und microRNA auf eine Degradation der mRNA hindeuten kann, die durch Bindung der microRNA an deren 3'-UTR ausgelöst werden könnte (siehe 1.9.2). Zudem wurde für potentielle mRNA-microRNA Paare eine computergestützte microRNA-Zielgen-Vorhersage (*in-silico target prediction*) durchgeführt. Dies ist ein wichtiger Schritt, um potentielle Interaktionen zu identifizieren, da einzelne microRNAs an bis zu mehreren hundert Zielgenen¹⁴³ binden können. Zur Zielgen-Vorhersage gibt es unterschiedliche Programme, die auf verschiedene Algorithmen zurückgreifen. Die folgenden vier Eigenschaften werden in den meisten Vorhersage-Programmen berücksichtigt: a) die Komplementarität der *seed*-Region, also die Watson-Crick-Paarung von microRNA und mRNA des Zielgens innerhalb der *seed*-Sequenz, b) das Vorhandensein konservierter Bereiche, c) die durch Bindung frei werdende Energie als Zeichen für die Stabilität des biologischen Systems und d) die Erreichbarkeit der Bindesequenz in der mRNA des Zielgens¹⁴⁴. Da sich die Programme in der Gewichtung der Eigenschaften unterscheiden, hat es sich durchgesetzt, unterschiedliche Algorithmen zur Vorhersage zu verwenden und diejenigen Zielgene weiter zu verfolgen, die von mehreren Programmen vorhergesagt wurden.

2.3.1 Korrelationsanalyse der mRNA- und microRNA-Expressionsdaten

Als Methode für die Korrelationsanalyse wurde die Spearman Rangkorrelation¹⁴⁵ verwendet, da es sich bei dem berechneten Rangkorrelationskoeffizienten um ein nicht-parametrisches Maß für Korrelation handelt, das Ausreißern gegenüber unempfindlich ist. Es wurden die Expressionwerte der differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs des Vergleiches Jejunum vs. Duodenum und des

Vergleichen Roux-Schenkel vs. Jejunum jeweils miteinander korreliert. Nur diejenigen mRNA-microRNA-Paare, die eine negative Korrelation mit einem p-Wert $< 0,05$ zeigten, wurden als potentiell relevant erachtet. Die Berechnung der Korrelationen erfolgte mittels der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 21.0.

2.3.2 microRNA-Zielgen-Vorhersage

Zunächst wurden unter den differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs der Vergleiche Jejunum vs. Duodenum und Roux-Schenkel vs. Jejunum diejenigen microRNA-mRNA-Paare identifiziert, für die bereits eine Interaktion experimentell validiert wurde. Diese bereits validierten microRNA-mRNA-Interaktionen wurden dem Programm miRWalk 2.0 der Universität Heidelberg entnommen¹⁴⁶. Im nächsten Schritt wurde mittels einer Zielgen-Vorhersage betrachtet, ob die im jeweiligen Vergleich differenziell exprimierten microRNAs potentiell an die entsprechenden im jeweiligen Vergleich differenziell exprimierten mRNAs binden könnten. Für diese Vorhersagen wurden die folgenden Algorithmen verwendet: TargetScan (*Release* 6.2 Juni 2012)^{111,128,143,147}, welches hauptsächlich die Komplementarität der *seed*-Region und das Vorhandensein konservierter Bereiche bewertet; DIANA-microT-CDS^{148,149}, das alle vier Eigenschaften mit in die Bewertung einbezieht und MicroCosm Targets Version 5¹¹⁷, das besonders die Komplementarität der *seed*-Region, das Vorhandensein konservierter Bereiche und die frei werdende Energie beurteilt. Die Zielgen-Vorhersage wurde für diejenigen microRNA-mRNA-Paare als besonders relevant erachtet, die eine signifikant negative Korrelation aufwiesen. Zusätzlich wurde im weiteren Verlauf der Analyse das Programm RNAhybrid verwendet, das neben den oben genannten Eigenschaften das Vorhandensein mehrerer Binderegionen der microRNAs innerhalb der 3'-UTR des Zielgens bewertet. RNAhybrid wurde verwendet, um jeweils eine weitere Bindestelle von miR-301a und miR-454 in der BCMO1-3'-UTR zu identifizieren.

2.4 Untersuchung der spezifischen Bindung von miR-130a, miR-301a und miR-454 an die BCMO1-3'-UTR

Um die vorhergesagte Bindung von microRNAs an die 3'-UTR der mRNA des Zielgens nachzuweisen, wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Zunächst wurde die 3'-UTR des betreffenden Zielgens in einen Luciferase-Vektor kloniert. Hierfür wurde aus der Vollbutprobe eines gesunden Probanden die genomische DNA isoliert, die im Weiteren als Matrize für die Klonierungs-PCR diente. In der PCR-Reaktion wurde die Sequenz der BCMO1-3'-UTR mittels genspezifischer Primer amplifiziert. Dieses PCR-Produkt wurde nach Aufreinigung und Verdau in den dephosphorylierten Luciferase-Vektor ligiert. Nach Vermehrung des Vektorkonstruktes in Bakterien und der Präparation der Plasmid-DNA, wurde diese zur Zelltransfektion für das Luciferase-Assay verwendet. Als Nachweis dafür, dass die vorhergesagte Bindestelle für den spezifischen Effekt im Luciferase-Assay verantwortlich war, wurde die *seed*-Region mittels gezielter Mutagenese (*side-directed mutagenesis*) mutiert. Mit diesen Vektorkonstrukten wurden ebenfalls Luciferase-Assays durchgeführt.

2.4.1 Kits, Verbrauchsmaterial

DNA-Isolations-Kit	Qiamp DNA blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
PCR Enzym Mix	High Fidelity PCR Enzym Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethidiumbromid (10 mg/ml)		Life Technologies (Darmstadt)
Ladepuffer	BlueJuice™ Gel Loading Buffer,	Life Technologies (Darmstadt)
DNA-Größenmarker	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA-Größenmarker	GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder,	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Gelextraktionskit	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid-DNA Präparation	QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid-DNA Präparation	QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
PCR Enzym Mix	KapaHiFi PCR Kit	Peqlab Biotechnologie GMBH (Erlangen)
Detachment-Lösung	Trypsin/EDTA Lösung (0,05%/ 0,02%)	Biochrom GmbH (Berlin)
Transfektionsreagenz	Lipofectamin® LTX & PLUS™ Reagent	Life Technologies (Darmstadt)
Luciferase-Assay	Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega (Mannheim)

2.4.2 Puffer und Lösungen

TCM-Lösung	100 mM Tris HCl, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM CaCl ₂ (pH 7,5)
LB g/l -Medium	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (pH 7,2)
LB-Agar	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15g Agar-Agar (pH 7,2)
1% Agarosegel	1% Agarose in 1x TBE-Puffer, 1 µg/ml Ethidiumbromid

2.4.3 Geräte

Kammer für Agarose-Gelelektrophorese	Sub-Cell® Model 192	Bio-Rad Laboratories (München)
Geldokumentationssystem	Kodak Image Station 440 CF	Kodak (Stuttgart)
Schüttelinkubator	3032	GFL mbH (Burgwedel)
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG (Hamburg)
Inkubator		Binder GmbH (Tuttlingen)
Schüttelplattform	Polymax 2040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach)
Zellkulturwerkbank	HeraSafe	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zellkulturbrutschrank	Hera Safe	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf AG (Hamburg)
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus GmbH (Hamburg)
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal-Kammer	Optik Labor Ltd (Lancing, Großbritannien)
Einfriercontainer	Nalgene® Cryo	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Luminometer	Veritas Mikroplatten Luminometer	Tuner Biosystems (USA)

2.4.4 Enzyme

Restriktionsenzym	<i>XhoI</i>	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
Restriktionsenzym	<i>DpnI</i>	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
Phosphatase	Antarctica Phosphatase	New England BioLabs (Frankfurt am Main)
Ligase	T4 Ligase	Life Technologies (Darmstadt)

2.4.5 Primersequenzen

BCMO1-3'-UTR Primer		Annealing Temperatur
BCMO1-F	GCCCTCGAG TGGTGTGGGGTTTGG*	60°C
BCMO1-R	GCCCTCGAG CAGACTTTAAAGTTT*	60°C

* fett gedruckt sind die Erkennungssequenzen des Restriktionsenzym

Sequenzierprimer

BCMO1-S-F	TGGTGTGGGGTTTGGGTAG	51°C
BCMO1-S-R	CAGACTTTAAAGTTTTATTA	51°C
BCMO1-S-3'	TCTGGTGGACTAAATTGTGTAT	54°C
BCMO1-S-5'	AATGATACTGACAAGCTCTCTT	54°C

Mutageneseprimer

BCMO1 F MU1	GCCTTTGTTACCTTT CATG ATTATTCTTTCTGTGG*	66°C
BCMO1 R MU1	CCACAGAAAGAATAAT CATG AAAGGTAACAAAGGC*	66°C
BCMO1 F MU2	ACAAGGGCAT ATAG AGAGAGCTTG*	56°C
BCMO1 R MU2	CAAGCTCTCT CTAT ATGCCCTTGT*	56°C

* fett gedruckt sind diejenigen Basen, die mutiert werden

2.4.6 Plasmide

Bei Plasmiden handelt es sich um ringförmig geschlossene, extrachromosomale, doppelsträngige DNA-Moleküle, die natürlicherweise in Bakterienzellen vorkommen. Die Plasmide werden autonom von der chromosomalen DNA repliziert und können Gene enthalten, die meist für Selektionsvorteile, wie Antibiotikaresistenzen, kodieren. Sie können durch Zellteilung weitergegeben oder durch Konjugation auf andere Bakterien übertragen werden. Aus diesem Grund werden sie in der Molekularbiologie als Vektoren verwendet, die Fremd-DNA auf Wirtszellen übertragen. Die minimalen Komponenten, die ein Plasmid-Vektor aufweist, sind ein Replikationsursprung, der als Ansatzstelle für die an der Replikation beteiligten Enzyme dient, ein Promotor als Bindestelle für die RNA-Polymerase, die multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*), welche Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme enthält und ein Selektionsmarker. Zudem sind Plasmid-Vektoren so konstruiert, dass Transfer- und Mobilisierungsgene fehlen, so dass eine natürliche Übertragung durch Konjugation sehr unwahrscheinlich ist. Für diese Arbeit wurden das pDsRed2-C1-Plasmid der Firma Clontech Laboratories Inc. (Mountain View, USA) und der pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vektor der Firma Promega (Mannheim) verwendet.

pDsRed2-C1-Plasmid Bei dem pDsRed2-C1-Plasmid handelt es sich um einen 4598 Basen großen Expressionsvektor, der für das *Discosoma sp. red fluorescent protein* codiert. Das DsRed-Protein kann mit einer Wellenlänge von 558 nm angeregt werden und zeigt ein Emissionsmaximum bei 583 nm. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde das Plasmid bei den Transfektionsversuchen mit microRNAs als leicht zu detektierende Transfektionskontrolle kotransfiziert.

pmirGLO Vektor Der pmirGLO Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector ist ein 7350 bp langer Reporter-Gen-Vektor, mit dem die Bindung von microRNAs an die 3'-UTR eines Zielgens untersucht werden kann. Der Vektor kodiert für zwei Luciferasegene, für die *Firefly (Photinus pyralis)*-Luciferase, den primären Reporter und für die *Renilla (Renilla reniformis)*-Luciferase, den Kontrollreporter. Die multiple Klonierungsstelle befindet sich zwischen der kodierenden Region der *Firefly*-Luciferase und der SV40 late Poly(A) Signalsequenz. Auf diese folgt die Sequenz für den SV40 *early enhancer/promoter* und die *Renilla*-Luciferase. Wenn der Leervektor abgelesen wird, werden sowohl die *Firefly* als auch die *Renilla*-Luciferase exprimiert. Nach der Insertion der 3'-UTR des Zielgens werden weiterhin beide Luciferasen exprimiert. Wenn allerdings eine microRNA an der eingefügten 3'-UTR des Zielgens bindet, wird die mRNA der *Firefly*-Luciferase destabilisiert, es kommt zu einem Translationsstopp, wodurch das detektierte Lichtsignal der *Firefly*-Luciferase reduziert wird. Die *Renilla*-Luciferase wird weiterhin unverändert exprimiert und dient so als endogene Kontrolle.

2.4.7 Zellkulturmedien

DMEM-Medium mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose + 10% fetales Kälberserum (FCS, FBS Superior) + 1% nicht essentielle Aminosäure	Life Technologies (Darmstadt) Biochrom (Berlin) Life Technologies (Darmstadt)
Einfriermedium 90% fetales Kälberserum (FCS, FBS Superior) 10% DMSO	Biochrom GmbH (Berlin) Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
OptiMEM	Life Technologies (Darmstadt)

Das FCS wurde vor dem Gebrauch für 30 min bei 56°C erhitzt, um Komplementfaktoren zu deaktivieren.

2.4.8 microRNAs/Pre-miRs

Pre-miR-130a-3p	PM10506	Life Technologies (Darmstadt)
Pre-miR-301a-3p	PM10978	Life Technologies (Darmstadt)
Pre-miR-454-3p	PM12343	Life Technologies (Darmstadt)
Pre-miR-Negative Control #1	AM17110	Life Technologies (Darmstadt)

2.4.9 Isolation der genomischen DNA

Die genomische DNA, die als Matrize für die Amplifikation der BCMO1-3'-UTR diente, wurde aus der Vollblutprobe eines gesunden kaukasischen Probanden mit dem Qiamp DNA Blood Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Silika-Gel Membran der Säule band spezifisch die zu isolierende DNA in Gegenwart chaotroper Salze, während Verunreinigungen die Membran passieren. Nach zwei Waschschrritten wurde die gereinigte DNA mit Wasser eluiert. Der Proband gab sein schriftliches Einverständnis, die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel befürwortend beraten und nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

2.4.10 Klonierung der BCMO1-3'-UTR in den pmirGLO Vektor

Die gesamte 3'-UTR der β -Caroten-15, 15-monooxygenase 1 (BCMO1) mit einer Länge von 564 Basen (RefSeq NM_017429; Stand 21.11.2012; Position: 81290578-81291142) wurde in den pmirGLO Vektor kloniert. Vorwärts- und Rückwärtsprimer wiesen die ersten bzw. letzten 16 Basen der BCMO1-3'-UTR Sequenz und zusätzlich eine Folge von 9 weiteren Basen auf. Innerhalb dieser 9 Basen befindet sich die Erkennungssequenz 5'...CTCGAG...3' für das Restriktionsenzym *Xho*I, welche aus 6 Basen besteht. Diese Erkennungssequenz war notwendig, um das PCR-Produkt nach einem Verdau mit *Xho*I gezielt in die *Xho*I-Schnittstelle des pmirGLO-Vektor ligieren zu können. Die Primersequenzen sind unter 2.4.5 angegeben. Für die PCR-Reaktion wurde der PCR High Fidelity Enzym Mix verwendet. Der PCR-Ansatz beinhaltete in einem Endvolumen von 50 μ l je 0,1 μ M Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 0,2 mM jedes dNTPs, 1x den High Fidelity PCR Puffer mit 1,5 mM $MgCl_2$ und 0,25 Einheiten des Mixes aus der Fermentas Taq-DNA-Polymerasen mit einer thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität und 1 μ g der Probanden-DNA. Für die PCR-Reaktion wurden folgende Bedingungen gewählt: initiale Denaturierung für 3 min bei 94°C gefolgt von 30 Zyklen mit einer

Denaturierung für 30 sec bei 94°C, einem *Annealing* für 30 sec bei 60°C und einem Elongationsschritt für 1 min bei 72°C. Die finale Elongation wurde für 10 min bei 72°C durchgeführt.

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt, das im Folgenden als Insert bezeichnet wird, mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und durch Anfärben mit Ethidiumbromid auf einem Geldokumentationssystem detektiert.

Nach Identifizierung der Bande des Inserts anhand des Größenmarkers, wurde diese aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert, um dNTPs, Primer und Nebenprodukte zu entfernen. Für die Gelextraktion wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Das Gelstück wurde für 10 min bei 50°C im 3-fachen Volumen eines Hochsalzpuffers, der das chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat enthält, geschüttelt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz auf eine Säule mit Silika-Membran gegeben, an der die DNA in Anwesenheit des Hochsalzpuffers bindet. Nach einem Waschschrift wurde die DNA mit Wasser eluiert.

Im Anschluss wurden sowohl 10 µg pmirGLO Vektor, als auch 10 µg des isolierten Insert mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* nach Herstellerangaben für 4h bei 37°C verdaut, um kompatible Enden für die Ligation zu erhalten.

Um eine Religation des Vektors nach dem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden des Vektors mit einer Phosphatase entfernt. Die Dephospholylierung wurde mit Hilfe der Antarctica Phosphatase von New England BioLabs durchgeführt. Es wurden 20 µg geschnittener Vektor mit 5 U Antarctica Phosphatase und 3,5 µl Antarctica Puffer für 30 min bei 37°C inkubiert und dann für 5 min bei 65°C inaktiviert. Im Anschluss wurden 12 µl Insert und 2 µl dephospholylierter pmirGLO Vektor mit der T4 Ligase von Life Technologies über Nacht bei 14°C ligiert.

2.4.11 Bakterienkultur

Für die Vermehrung der Plasmide wurden *Escherichia coli* vom Stamm DH5α (*E. coli*, CCRC 51731, DSMZ, Braunschweig) verwendet. Die Bakterien wurden in einer LB-Medium Flüssigkultur gehalten. Zur Anzucht von Kolonien wurden sie auf Platten

bestehend aus LB-Agar ausplattiert. Während die DH5 α Bakterien ohne Antibiotikum gehalten wurden, wurde den Bakterien nach Transformation mit dem pmirGLO Vektor 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und nach Transformation mit dem dsRed2-C1 Plasmid 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zur Selektion entsprechend ihrer Selektionsmarker zugesetzt. Die Flüssigkulturen wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm kultiviert, während die Agarplatten für ca. 16 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert wurden. Um eine Bakterienkultur über eine längere Zeit zu lagern, wurden Glycerolstocks, bestehend aus 850 μl der Bakteriensuspension und 150 μl Glycerin, angesetzt. Diese Stocks wiesen eine Endkonzentration von 15% Glycerin auf und wurden bei -80°C gelagert.

2.4.12 Herstellung kompetenter Bakterien

Da die DH5 α Bakterien nicht natürlich kompetent sind, mussten zunächst kompetente Bakterien hergestellt werden, die die Plasmid-DNA bei der Transformation aufnehmen konnten. Hierfür wurde die Calciumchlorid-Methode angewendet. 200 ml LB-Medium wurden mit 2 ml Über-Nacht-Kultur beimpft und bei 37°C und 180 rpm 2-3 h inkubiert bis zu einer OD₅₉₀ von 0,375. Dann wurde die Kultur für 10 min auf Eis gekühlt und im Anschluss 7 min bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 8 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Herstellen von GlycerolstammLösung wurden 1,4 ml Glycerin zugesetzt, um eine Endkonzentration von 15% zu erreichen. Diese Lösung wurde aliquotiert und in 150 μl Aliquots bei -80°C gelagert.

2.4.13 Hitzeschock-Transformation

Bei der Transformation wurden die kompetenten Bakterien zunächst mit Calciumchlorid behandelt, was zu einer Verminderung der abstoßenden Kräfte zwischen negativ geladener Zellmembran und ebenfalls negativ geladener Plasmid-DNA führt. Der Hitzeschock führte zu einer kurzzeitigen Porenbildung und ermöglicht der Plasmid-DNA so ins Zellinnere zu diffundieren. Die kompetenten Bakterien wurden mit der vorgelegten Mischung aus 50 μl der sterilen TCM-Lösung und 2-10 μg Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Dieser Transformationsansatz wurde einem Hitzeschock von 30 sec bei 42°C ausgesetzt. Im nächsten Schritt

wurden 400 µl LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C und 400 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf antibiotikahaltige Agarplatten, entsprechend der Resistenz des Plasmids, ausplattiert und über Nacht bei 37°C gehalten. Die gewachsenen Kolonien wurden in Flüssigkulturen überimpft, um die Plasmid-DNA zu vermehren.

2.4.14 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde aus den Flüssigkulturen der Bakterien mittels alkalischer Lyse isoliert. Hierfür wurden je nach Größe des Flüssigkulturansatzes entweder das QIAGEN Plasmid Mini Kit oder das QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Bakterienpellets wurden in einem EDTA-haltigen Puffer resuspendiert, um zweiwertige Kationen, die für die Stabilität der Zellwand wichtig sind, zu komplexieren. Die Zugabe von SDS führte zu einer vollständigen Lyse der Zellen durch Solubilisation der Phospholipide und Proteine der Zytoplasmamembran, während NaOH Proteine, Chromosomen und Plasmid-DNA denaturiert. Durch Neutralisation mit Kaliumacetat renaturierte die Plasmid-DNA wieder, während die denaturierte chromosomale DNA der Bakterien als unlösliches Aggregat ausfällt. Nach Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte die Adsorption der Plasmid-DNA an Silikagel-Säulen (Miniprep) oder an Anionen-Austauscher-Säulen (Maxiprep). Nach Waschschritten, die Verunreinigungen wie RNA oder Proteine entfernen, erfolgte die Elution bei der Miniprep unter geringer Salzkonzentration, wobei das erhaltene Eluat die gereinigte Plasmid-DNA enthält. Bei der Anwendung von Anionen-Austauscher-Säulen während der Maxiprep erfolgt die Elution unter Hochsalzbedingungen, und die Plasmid-DNA wurde nachfolgend durch Fällung mit Isopropanol gewonnen.

Die fertigen Konstrukte wurden bei GATC Biotech in Köln zur Kontrolle mittels des Ketten-Abbruch-Verfahrens nach Sanger sequenziert ¹⁵⁰. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer finden sich unter 2.4.5. Die Primer BCMO1-S-F und BCMO1-S-R schließen das Insert als Vorwärts- und Rückwärtsprimer ein. Die Primer BCMO1-S-3' und BCMO1-S-5' binden innerhalb des Inserts und ermöglichen eine Sequenzierung über die Insertgrenzen am 3'-bzw. am 5'-Ende hinweg und damit eine Kontrolle der Orientierung des Inserts im Vektor.

2.4.15 Gezielte Mutagenese

Die gezielte Mutagenese (*site directed mutagenesis*) ermöglicht es, an einer definierten Position in einer DNA-Sequenz Punktmutationen einzufügen. Mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern, welche die gewünschten Mutationen enthalten, und einer Polymerase mit Korrekturleseaktivität wird eine PCR-Reaktion auf dem Template-Plasmid durchgeführt. Anschließend wird der PCR-Ansatz mit *DpnI* verdaut. *DpnI* besitzt die Fähigkeit, spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber unmethylierte DNA zu schneiden. Durch den Verdau wird so die methylierte Template-DNA abgebaut, wohingegen das PCR-Produkt, das unmethyliert vorliegt, erhalten bleibt. Der Ansatz wird dann in kompetente Bakterien transformiert, und nach Vermehrung wird die Plasmid-DNA mittels Plasmid Präparation isoliert.

Diese Methode wurde genutzt, um 4-5 Basen je nach Primerpaar (Primersequenz siehe 2.4.5) in den *seed*-Regionen der microRNAs in der BCMO1-3'-UTR zu mutieren und so die Bindungsspezifität in diesem bestimmten Bereich der Sequenz mittels Luciferase-Assay nachzuweisen. Für die gezielte Mutagenese wurde das KapaHifi PCR Kit von Peqlab nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR Reaktion wurde mit 18 Zyklen durchgeführt, und die Elongationszeit betrug 8 min. Es wurden folgende drei Konstrukte hergestellt:

Vektorkonstrukt (MU1): Für dieses Konstrukt wurde der pmirGLO Vektor, der die gesamte BCMO1-3'-UTR enthielt, als Template verwendet. Es wurden fünf Basen in der *seed*-Region, der von TargetScan, DIANA-micro T-CDS und MicroCosm Targets vorhergesagten microRNA-Bindestelle unter Verwendung der Primer BCMO1 F MU1 und BCMO1 R MU1 mutiert. Es handelte sich um die Basen in Position 94-98 der BCMO1-3'-UTR Sequenz.

Vektorkonstrukt (MU2): Für dieses Konstrukt wurde der pmirGLO Vektor, der die gesamte BCMO1-3'-UTR enthielt, als Template verwendet. Es wurden vier Basen in der *seed*-Region, der von RNAhybrid vorhergesagten microRNA-Bindestelle unter Verwendung der Primer BCMO1 F MU2 und BCMO1 R MU2 mutiert. Es handelte sich um die Basen in Position 132-135 der BCMO1-3'-UTR Sequenz.

Vektorkonstrukt (MU1 + MU2): Für dieses Konstrukt wurde das Vektorkonstrukt MU1 als Template verwendet, welches bereits fünf mutierte Basen in Position 94-98 der BCMO1-3'-UTR Sequenz enthielt. Zusätzlich wurden vier weitere Basen in Position 132-135 der BCMO1-3'-UTR Sequenz mutiert.

2.4.16 Zellkultur

Die Arbeiten in der Zellkultur wurden alle an einer Sterilbank durchgeführt. Für diese Arbeit wurden CaCo2 Zellen (ACC 169, DSMZ, Braunschweig) verwendet und unter Standard-Zellkulturbedingungen bei 37°C Lufttemperatur und 5% CO₂ in DMEM-Medium, versetzt mit nicht-essentiellen Aminosäuren, kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte im 2-2-2-3-Tage-Rhythmus. Bei den CaCo2 Zellen handelt es sich um eine humane Kolonadenokarzinomzelllinie, die auf Zellen zurückgeht, die 1974 aus einem primären Kolonadenokarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes gewonnen wurden ¹⁵¹⁻¹⁵³.

2.4.17 Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach der langsamen Überführung der Zellsuspension in ein mit 10 ml Kulturmedium gefülltes Falkon-Röhrchen wurden sie 5 min bei 1200 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 12 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt.

2.4.18 Passagieren und Zählen der Zellen

Die CaCo2 Zellen wurden je nach Zelldichte alle 4-5 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen zunächst 2x mit 4 ml warmem 1x PBS gewaschen und dann für 2 min mit 4 ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05% / 0,02%) inkubiert. Nach Zugabe von serumhaltigem DMEM-Medium zum Abstoppen der Reaktion wurden verbliebene adhärenente Zellen mechanisch vom Flaschenboden gelöst und die Suspension für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in frischem Medium wurde die Zellzahl mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt, um dann eine definierte Zellzahl weiter zu kultivieren.

2.4.19 Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden wie unter 2.4.18 beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und anschließend 5 min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurde das Kryoröhrchen bei -80°C in einem Einfriercontainer gelagert, um den Einfriervorgang zu verlangsamen und so die Bildung intrazellulärer großvolumiger Kristalle, welche die Zellen schädigen können, zu verhindern. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen aus dem Einfriercontainer entnommen und direkt bei -80°C eingefroren.

2.4.20 Luciferase-Reportergen-Assay

Das Luciferase-Reportergen-Assay wurde durchgeführt, um die Bindung der microRNAs an die BCMO1-3'-UTR zu untersuchen. Die Funktionsweise des pmirGLO Vektors wurde bereits unter 2.4.6 erläutert. Für das Luciferase-Assay wurde das Dual-Luciferase Reporter Assay System von der Firma Promega nach Herstellerangaben verwendet. Nachdem die 3'-UTR des Zielgens, BCMO1, in den unter 2.4.6 beschriebenen pmirGLO Vektor an das 3'-Ende des kodierenden Bereiches der *Firefly*-Luciferase kloniert worden war, wurden die CaCo2 Zellen mit diesem Vektorkonstrukt und einer pre-miR bzw. der pre-miR-Negativkontrolle kotransfiziert. Solange keine Bindung der microRNA an die 3'-UTR-Sequenz des Zielgens erfolgt, werden beide Luciferasen gebildet und setzen die im Luciferase-Assay zugegebenen Substrate gleichmäßig um. Wenn es allerdings zu einer Bindung der microRNA an die 3'-UTR des Zielgens kommt, wird die mRNA der *Firefly*-Luciferase destabilisiert, es kommt zu einem Translationsstopp und dadurch zu einer reduzierten Menge an *Firefly*-Luciferase, welche dementsprechend weniger Substrat umsetzt, so dass das detektierte Lichtsignal der *Firefly*-Luciferase vermindert ist. Die *Renilla*-Luciferase, welche als endogene Kontrolle dient, wird auch bei microRNA-Bindung weiterhin unverändert translatiert und setzt unverändert ihr Substrat um.

Das System der simultanen Messung von Lumineszenzsignalen zweier Luciferasen funktioniert, da sich die *Firefly* und *Renilla*-Luciferase in ihren Substratspektren deutlich voneinander unterscheiden. Zunächst wird während der Durchführung des Luciferase-Assays das Luciferase Assay Reagent II, welches das Leuchtkäfer

Luciferin enthält, in Anwesenheit von ATP, O₂ und Mg²⁺ durch die *Firefly*-Luciferase zu Oxyluciferin, AMP, CO₂, PP_i und Licht umgesetzt. Dieses Lichtsignal wird quantifiziert und dann durch Zugabe des Stop & Glow Reagents aufgehoben. Zusätzlich enthält das Stop & Glow Reagent Coelenterazin, welches als Substrat für die *Renilla*-Luciferase dient und zusammen mit O₂ zu Coelenteramid, CO₂ und dem zu quantifizierenden Lichtsignal umgesetzt wird.

Für den Versuchsansatz wurden zunächst 2x10⁴ CaCo2 Zellen pro Reaktionsgefäß in einer Platte mit 96 Mikroreaktionsgefäßen für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden dann jeweils sowohl mit dem Vektorkonstrukt als auch mit 100 nM pre-miR-130a, pre-miR-301a, pre-miR-454 oder pre-miR-Negativkontrolle mit Hilfe von Lipofectamin® LTX transient transfiziert. Bei Lipofectamin® handelt es sich um eine Formulierung aus kationischen Lipiden, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA Komplexe bilden. Diese Komplexe fusionieren dann mit den zu transfizierenden Zellen bzw. werden durch Endozytose von diesen aufgenommen.

Pro Reaktionsgefäß wurden entsprechend 100 nM der pre-miRs oder der pre-miR-Negativkontrolle mit 19 µl OptiMEM, 100 ng des Vektorkonstruktes und 0,5 µl PLUS™ Reagent für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 1,75 µl Lipofectamine® LTX zu jedem Ansatz und einer weiteren Inkubationszeit von 25 min wurden die 20 µl des Transfektionskomplexes zu 100 µl frischem Kulturmedium pro Reaktionsgefäß gegeben. 24 h nach der Transfektion wurde überschüssiger Transfektions-komplex entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 2x mit einem Volumen von 30 µl eiskaltem 1x PBS gewaschen und 25 min mit dem Passive Lysis Puffer bei Raumtemperatur auf einer Schüttelplattform inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Zelllysate in eine Luminometerplatte mit 96 Reaktionsgefäßen überführt und auf dem Veritas Mikroplatten Luminometer vermessen. Es handelt sich bei dem Luminometer um ein Autoinjektor-System, bei dem abweichend vom Herstellerprotokoll für beide Injektoren das Volumen auf 50 µl und die Zeit auf 2 sec und 10 sec eingestellt wurde.

Bei der Datenauswertung wurden die Signale der Ansätze, die mit pre-miRs transfiziert wurden, auf die Signale der Ansätze, die mit pre-miR-Negativkontrolle

transfiziert wurden, normalisiert. Dasselbe wurde für den auf jeder Platte mitgemessenen Leervektor durchgeführt.

Zum Schluss wurde der Wert des Vektorkonstruktes auf den Wert des Leervektors normalisiert: [Vektorkonstrukt + pre-miR / Vektorkonstrukt + pre-miR-NC] / [Leervektor + pre-miR / Leervektor + pre-miR-NC].

2.5 Effekt von miR-301a und miR-454 auf die Translation von BCMO1

2.5.1 Kits, Verbrauchsmaterial

Proteinisolation	Qproteome Mammalian Protein Prep Kit	Qiagen (Hilden)
Proteingehaltsbestimmung	Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories (München)
Blocking-Reagenz	Amersham Blocking Reagenz	GE Healthcare (München)
Chemilumineszenz-Substrat	Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (Hamburg)
Chemilumineszenz-Substrat	West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific (Waltham, USA)
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran	Merck KgaA (Darmstadt)
Röntgenfilme	CEA RP NEW 18 x 24	CEA GmbH (Hamburg)

2.5.2 Puffer, Lösungen

10x PBS (pH 7,2)	Gibco (Life Technologies (Darmstadt))
10x TBS	1,5 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0)
TBS-Tween (TTBS)	1x TBS, 0,1% Tween 20
10x Laufpuffer	2 M Glycin, 250 mM Tris Base
1x Laufpuffer	1:10 Verdünnung 10x Laufpuffer, 1% SDS
10% APS	1g APS (Ammoniumperoxodisulfat) in 10 ml ddH ₂ O
Sammelgelpuffer	500 mM Tris Base, 0,1% SDS (pH 6,8 mit HCl eingestellt)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base, 0,1% SDS (pH 8,8 mit HCl eingestellt)
Sammelgel (5%ig)	500 mM Tris/HCl (pH 6,8), 5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED
Trenngel (8,5%ig)	370 mM Tris/HCl (pH 8,8), 8,5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 0,1% SDS, 0,5% APS, 0,05% TEMED
Transferpuffer	1x Laufpuffer, 20% (v/v) Methanol
Block-Lösung	1x TBS, 5% Magermilchpulver
Wasch-Puffer	1x TBS, 0,5% Tween
ECL-Strippingpuffer	62,5 mM Tris, 2% (w/v) SDS, 100 mM Beta-Mercaptoethanol (pH 6,8)
10x TBE	890 mM Tris Base, 890 mM Borsäure, 0,5 M Na ₂ EDTA (pH 8,0)

2.5.3 Geräte

Mikroplatten-Leser	Tecan infinite M200 Pro	Tecan (Maennedorf, Schweiz)
Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf AG (Hamburg)
Nass-Blotting-System	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
Entwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa (Köln)

2.5.4 Software

Image J 1.47v	Wayne Rasband,NIH (USA)
IBM SPSS Statistics 21.0	IBM (Ehningen)

2.5.5 Antikörper

Primärer Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Molekulargewicht
anti-BCMO1 (K-14) (sc-163736)	Ziege	1:750	Santa-Cruz Biotechnologies (Heidelberg)	63 kDa
anti-ZO1 (AB2272)	Kaninchen	1:1000	Merck KgaA (Darmstadt)	260 kDa
anti-β-Aktin (AC-74) (A2228)	Maus	1:10000	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)	42 kDa
anti-dsRed (632392)	Maus	1:1000	Clontech Laboratories Inc. (Mountain View, USA)	29 kDa

Sekundärer Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
anti-mouse (A2228)	Kaninchen	1:10000	Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
anti-rabbit (sc-2004)	Ziege	1:10000	Santa Cruz Biotechnologie (Heidelberg)
anti-goat (sc-2020)	Esel	1:10000	Santa Cruz Biotechnologie (Heidelberg)

2.5.6 Transiente Transfektion der CaCo2 Zellen mit microRNAs

Um den Einfluss von hsa-miR-301a und hsa-miR-454 auf die Translation von BCMO1 näher zu untersuchen, wurde ein Transfektions-Experiment mit den entsprechenden pre-miRs in CaCo2 Zellen durchgeführt.

Hierzu wurden CaCo2 Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Reaktionsgefäß in einer Zellkulturplatte mit 24 Reaktionsgefäßen ausgesät und für 72 h kultiviert. Nach

72 h wurde das alte Zellmedium durch 500 µl frisches Kulturmedium ersetzt. Die transiente Transfektion der Zellen erfolgte unter Anwendung von Lipofectamin® LTX & PLUS™ Reagent. In dem Experiment wurden je nach Ansatz entweder 100 nM pre-miR-Negativkontrolle, pre-miR-301a oder pre-miR-454 in 100 µl OptiMEM Medium gegeben. Nach dem Hinzufügen von 3 µg der dsRed2-C1 Plasmid-DNA (siehe 2.4.6) und 3 µl PLUS™ Reagent je Ansatz, wurde dieser für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde jeweils 1 µl Lipofectamin® LTX hinzugegeben, gefolgt von einer Inkubationszeit von 25 min bei Raumtemperatur. Im letzten Schritt wurden jeweils 100 µl des Transfektions-Komplexes zu jedem Reaktionsgefäß der Zellkulturplatte hinzugefügt.

Nach 24 h wurde das Medium mit 600 µl frischem Kultur-Medium ersetzt, und nach weiteren 24 h wurde die Fluoreszenz des als Transfektionskontrolle kotransfizierten dsRed-Proteins auf einem Mikroplatten-Leser der Firma Tecan bei einer Emissionswellenlänge von 583 nm gemessen. Nach dem Ernten und Abzentrifugieren für 2 min bei 14000 rpm wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.7 Proteinisolation und Bestimmung des Proteingehaltes

Mit Hilfe des Qproteome Mammalian Protein Prep Kits wurden die Proteine aus dem Zellpellet isoliert. Nach Zusatz von 1 U Benzonase® Nuclease und 10 µl Protease Inhibitor (100x) zu 1 ml Mammalian Lysis Puffer wurde das Zellpellet in 50 µl resuspendiert. Die Benzoase Nuclease baut Nukleinsäuren ab, während der Protease Inhibitor die gelösten Proteine vor enzymatischem Abbau schützt. Nach 5 minütiger Inkubation bei 4°C auf einem Schüttler, wurde das Lysat 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den isolierten Proteinen wurde in ein neues Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde der Proteingehalt mit dem Bio-Rad Protein Assay, das auf der Methode von Bradford ¹⁵⁴ basiert, bestimmt.

2.5.8 Western-Blot

Nach Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe durch Verwendung einer diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden diese mittels eines Nass-Blotting-Systems auf eine zuvor mittels Methanol aktivierte Polyvinyliden-

difluorid (PVDF)-Membran übertragen. Der Transfer wurde 75 min bei 100 V durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden die freien Bindestellen der Membran mit 5% (v/v) Amersham Blocking Reagenz gelöst in 1x Tris Salzpuffer (TBS) abgesättigt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Nach dem Entfernen des Blocking-Reagenzes wurde die Membran über Nacht bei 4°C im ersten Antikörper, welcher in 5% (v/v) Blocking-Reagenz gelöst war, inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 5x für 10 min mit 1x TTBS gewaschen und danach für 1 h in dem zweiten Antikörper, gelöst in 2,5% (v/v) Blocking-Reagenz, inkubiert. Nach nochmaligem Waschen (5x 10 min mit 1x TTBS) wurde die Membran bis zur Entwicklung in 1x TBS aufbewahrt. Der zweite Antikörper ist Peroxidase-konjugiert. Dies ermöglicht die Detektion der Antikörperbindung mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion. Die Membran wurde für 5 min mit dem Chemilumineszenz-Substrat inkubiert. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrates und führt so zu einer Lichtemission, die mit einem Röntgenfilm erfasst werden kann. Da die β -Aktin Banden eine hohe Signalstärke aufweisen, wurden sie mit ECL als Substratlösung inkubiert, wohingegen für die anderen Antikörper die sensitivere West Femto Substratlösung verwendet wurde. Die Belichtung der Röntgenfilme (CEA, Hamburg) erfolgte mithilfe einer Entwicklerkassette (X-Ray Cassette IEC60406, Rego, Augsburg) in einer Dunkelkammer. Der Röntgenfilm wurde mit einer Entwicklungsmaschine Curix 60 entwickelt. Für die densitometrische Auswertung der Western-Blot Signale wurde die Software Image J 1.47v¹⁵⁵ verwendet. Die Signale wurden im Anschluss mit Hilfe des Programmes IBM SPSS Statistics 21.0 statistisch ausgewertet.

2.6 Untersuchung des Einflusses von Gallensäuren auf BCMO1

2.6.1 Gallensäuren

Cholsäure (CA)	C1129	Sigma Aldrich (St. Louise, USA)
Chendodeoxycholsäure (CDCA)	C9377	Sigma Aldrich (St. Louise, USA)
Deoxycholsäure (DCA)	D2510	Sigma Aldrich (St. Louise, USA)
Lithocholsäure (LCA)	L6250	Sigma Aldrich (St. Louise, USA)

2.6.2 Software

TRANSFAC	www.biobase-international.com
----------	--

2.6.3 Versuch zur Untersuchung des Einflusses von Gallensäuren

Der Einfluss verschiedener Gallensäuren auf die BCMO1 mRNA-Expression und den Proteingehalt sowie auf die Expression von miR-301a sollte untersucht werden. Hierfür wurde ein *in-vitro* etabliertes Zellmodell mit CaCo2 Zellen verwendet. Zunächst wurden die Gallensäuren (Cholsäure, Chendodeoxy-cholsäure, Deoxycholsäure und Lithocholsäure) in reinem DMSO gelöst. Von jeder Gallensäure wurde eine 100 mM Stock-Lösung angesetzt, die für den späteren Bedarf bei -20°C eingefroren wurde.

Für den Versuch wurden 5×10^5 CaCo2 Zellen/Reaktionsgefäß in einer Zellkulturplatte mit 24 Reaktionsgefäßen ausgesät und für 21 Tage kultiviert. Die Kultivierung der Zellen über elf Tag nach Entstehung des Monolayers führte zur Differenzierung, sodass die CaCo2 Zellen dünn darmzellartige Fähigkeiten ausbilden¹⁵⁶ und so als Modell für den oberen Dünndarm genutzt werden können. Diese Zellen wurden für 24 h entweder mit 100 µM der jeweiligen Gallensäure oder DMSO, das als Vehikel diente, im Kulturmedium inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mechanisch von dem Boden des Reaktionsgefäßes gelöst. Die Zellsuspension wurde für 2 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Die Zellpellets wurden bei -80°C aufbewahrt, bis Gesamt-RNA und Proteine isoliert wurden. Im Anschluss wurde in diesen Proben die relative mRNA-Expression und der Proteingehalt von BCMO1 (siehe 2.2.6 und 2.5.7), sowie die Expression von miR-301a bestimmt (siehe 2.2.7.6).

2.6.4 *In-silico* Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen

Um zu ermitteln, ob die Ergebnisse des Gallensäureversuches eventuell auf die Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren in den Promotorregionen von miR-301a und BCMO1 zurückzuführen sind, wurde eine computergestützte Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen durchgeführt. Hierfür wurde das Programm TRANSFAC (www.biobase-international.com) Version 2014.4 verwendet¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Das Programm wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Edmund Maser vom Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler der Christian-Albrechts-Universität Kiel zur Verfügung gestellt. Bei TRANSFAC handelt es sich um eine manuell erstellte Datenbank, die eukaryotische Transkriptionsfaktoren und deren genomische Bindungsstellen sowie DNA-Bindungsprofile enthält. Diese Informationen ermöglichen die Vorhersage potentiell regulatorischer Elemente in unbekanntem Promotoren. Als Grundlage für die Vorhersage der potentiellen Bindestellen diente das humane Referenzgenom Genome Reference Consortium Human Genome build 38 (GRCh38). Um potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen zu identifizieren, welche die BCMO1 bzw. miR-301a Expression im Zusammenhang mit Gallensäuren regulieren könnten, wurden jeweils die von TRANSFAC am besten unterstützten Promotorregionen untersucht. Für BCMO1 wurde auf Chromosom 16 der Bereich zwischen den Nukleotidpositionen 81228059-81240159 betrachtet und für miR-301a wurde auf Chromosom 17 der Bereich 59149671-59161771 untersucht.

2.7 Statistik

Für die statistische Datenauswertung wurden die Software R (Version 3.1.0) und das Statistikprogramm IBM SPSS Statistics 21.0 verwendet. Die statistische Signifikanz wurde, wenn nicht anders angegeben, mittels des Mann-Whitney-U-Tests berechnet. Werte wurden ab einem p-Wert < 0,05 als statistische signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der mRNA- und microRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms von RYGB-Patienten

3.1.1 Charakterisierung der Patientenkohorte

In diese Studie wurden zwölf stark übergewichtige Patienten eingeschlossen, die unter einer Adipositas Grad III ($\text{BMI} \geq 40 \text{ kg/m}^2$) litten (siehe Tabelle 3). Vor der proximalen Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation wiesen diese Patienten im Durchschnitt einen BMI von $51,0 \pm 6,3 \text{ kg/m}^2$ auf. Acht der zwölf Patienten zeigten einen therapiepflichtigen Diabetes mellitus Typ 2. Von ihnen erhielten zwei Patienten Insulin, zwei weitere eine Kombination aus Insulin und oralen Antidiabetika, und drei Patienten erhielten ausschließlich orale Antidiabetika; für einen Patienten waren keine Angaben zur antidiabetischen Therapie verfügbar. Zudem bekamen acht Patienten eine antihypertensive Pharmakotherapie, welche β -Blocker, Diuretika, ACE-Hemmer, AT-1-Rezeptorantagonisten und Calciumkanalantagonisten umfasste. Durch die Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation verloren alle Patienten innerhalb eines Jahres signifikant an Körpergewicht. Das Übergewicht reduzierte sich um 69% (im Bereich von 32% - 86%, $p < 3 \cdot 10^{-6}$) und der BMI um 34% auf $33,6 \pm 5,9 \text{ kg/m}^2$. Zudem verbesserten sich die Komorbiditäten. Ein Jahr nach RYGB erhielten insgesamt nur noch zwei der Patienten eine antidiabetische Pharmakotherapie mit oralen Antidiabetika und nur fünf Patienten bekamen weiterhin eine antihypertensive Pharmakotherapie. Insgesamt reduzierte sich die Menge an eingenommenen Arzneistoffen bei den Patienten deutlich.

Tabelle 3 Charakteristika der RYGB-Patienten

Patientencharakteristika	vor RYGB	1 Jahr nach RYGB
Geschlecht (W/M)	10 / 2	10 / 2
Alter (Jahre)	$42,3 \pm 9,7^a$	$43,3 \pm 9,7^a$
Größe [m]	$1,71 \pm 0,09^a$	$1,71 \pm 0,09^a$
Gewicht [kg]	$148,6 \pm 23,1^a$	$97,9 \pm 19,0^a$
BMI [kg/m^2]	$51,0 \pm 6,3^a$	$33,6 \pm 5,9^a$
Therapiepflichtiger Diabetes mellitus Typ 2 (N)	8	3
Antihypertensive Pharmakotherapie (N)	8	5

^aMittelwert \pm Standardabweichung; W = weiblich, M = männlich

3.1.2 Analyse der mRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms

Der Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Untersuchung der mRNA-Expressionsprofile des Roux-Schenkels und deren Vergleich zum physiologischen Dünndarm, um mögliche, durch die RYGB-Operation ausgelöste, Veränderungs- und Adaptationsprozesse zu identifizieren. Hierzu wurden die mRNA-Expressionsprofile von Duodenum und Jejunum der zwölf Patienten vor der RYGB-Operation, sowie vom Roux-Schenkel ein Jahr nach der Operation mit Affymetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays vermessen. Insgesamt wurden 21956 Transkripte detektiert. In die weitere Datenauswertung gingen nur diejenigen mRNAs ein, die in mindestens 80% der Proben einen Expressionswert aufwiesen. In den drei Gewebevergleichen (Jejunum vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Duodenum und Roux-Schenkel vs. Jejunum) zeigten insgesamt 149 mRNAs in mindestens einem Vergleich eine differenzielle Expression. Als differenziell exprimiert galt eine mRNA dann, wenn sie in mindestens einem Vergleich die folgenden Bedingungen erfüllte: Sie musste entweder einen *fold change* $< -1,5$ oder $> 1,5$ aufweisen. Zusätzlich musste sie eine *false discovery rate* (FDR) $< 5\%$ zeigen und mindestens 50% distinkt exprimiert sein (für Details siehe 2.2.7.2).

Während sich Jejunum und Duodenum unter physiologischen Bedingungen vor der Operation nur in 29 differenziell exprimierten mRNAs unterschieden (Abbildung 5 (gelb); Anhang: Tabelle 1), zeigte der Roux-Schenkel gegenüber Duodenum und Jejunum deutlich stärkere Unterschiede. Im Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum wurden 86 differenziell exprimierte mRNAs identifiziert (Abbildung 5 (blau); Anhang: Tabelle 2), und der Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum zeigte 68 differenziell exprimierte mRNAs (Abbildung 5 (rot Anhang: Tabelle 3).

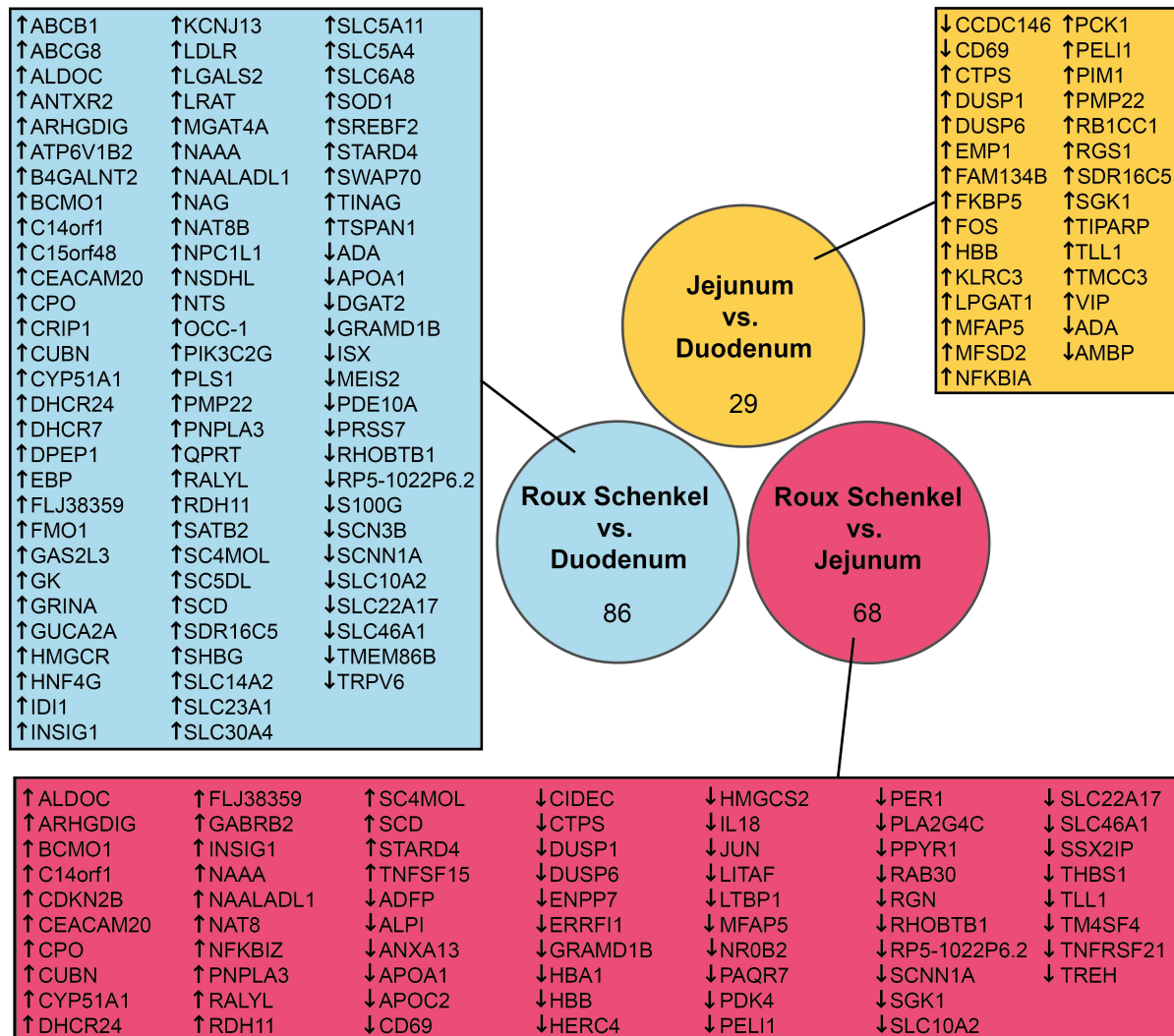


Abbildung 5 Differenziell exprimierte mRNAs in den drei Gewebevergleichen.

Jeder Kreis steht für die im jeweiligen Vergleich differenziell exprimierten mRNAs. Die Pfeile weisen auf eine Auf- bzw. Herabregulation des jeweiligen Gens hin, wobei im Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum, das Jejunum als Referenz diente, während sich die Veränderung der Expression in den anderen beiden Vergleichen auf das Duodenum bezieht.

Einige der 149 identifizierten mRNAs waren in mehr als einem Gewebevergleich differenziell reguliert. Diese sind in Abbildung 6 in den Schnittmengen des Venn-Diagramms dargestellt. Das Duodenum wies drei mRNAs auf, die im Vergleich zum Jejunum (Jejunum vs. Duodenum) und im Vergleich zum Roux-Schenkel (Roux-Schenkel vs. Duodenum) differenziell reguliert waren und somit das Duodenum spezifisch charakterisierten (Abbildung 6 A). Das Jejunum zeigte neun mRNAs, die gegenüber Duodenum (Jejunum vs. Duodenum) und Roux-Schenkel (Roux-Schenkel vs. Jejunum) eine differenzielle Expression aufwiesen (Abbildung 6 B). Der Roux-Schenkel zeigte mit 26 mRNAs die größte Anzahl an mRNAs, die sowohl im

Vergleich zum Duodenum (Roux-Schenkel vs. Duodenum), als auch im Vergleich zum Jejunum (Roux-Schenkel vs. Jejunum) differenziell reguliert waren und ihn so spezifisch charakterisierten (Abbildung 6 C).

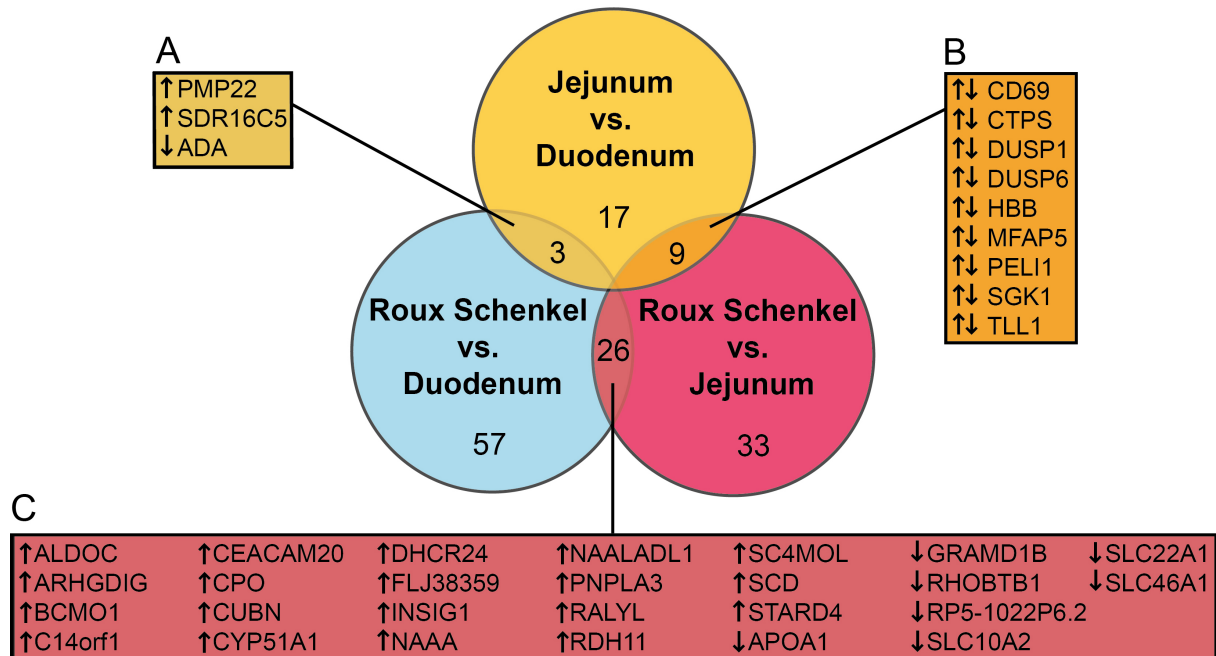


Abbildung 6 mRNAs, die in mehr als einem Vergleich eine differenzielle Regulation aufwiesen. Das Venn-Diagramm basiert auf den 149 in den drei Vergleichen differenziell exprimierten mRNAs. Die Überlappungsflächen zeigen diejenigen mRNAs, die in mehr als einem Vergleich differenziell reguliert sind. Die Pfeile stehen für eine Auf- bzw. Herabregulation des jeweiligen Gens, wobei sich in B die links stehenden Pfeile auf den Vergleich Jejunum vs. Duodenum und die rechts stehenden Pfeile auf den Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum beziehen.

3.1.3 Hauptkomponentenanalyse der differenziell exprimierten mRNAs

Um einen besseren Überblick über die mRNA-Expressionsdaten zu erlangen und die Identifikation möglicher Muster in den Expressionsdaten zu erleichtern, wurde eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt. Diese basierte auf den z-transformierten Expressionswerten der 149 differenziell exprimierten mRNAs. In Abbildung 7 repräsentiert jeder Kreis das Expressionsprofil einer Gewebeprobe. Je näher zwei Proben zusammenliegen, desto ähnlicher sind sich deren Expressionsprofile, und je weiter sie voneinander entfernt liegen, desto stärker unterscheiden sich diese. Die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2, die hier abgebildet sind, erklären zusammen 54% der Varianz der einbezogenen mRNA-Expressionsdaten.

Die Proben, die aus denselben Geweben entnommen wurden, liegen jeweils in Clustern eng zusammen. Dies weist auf eine große Homogenität der gewebe-spezifischen mRNA-Expressionsprofile der Proben hin.

Die Proben aus Duodenum und Jejunum, welche den oberen Dünndarm vor der Operation repräsentieren, zeigen jeweils ein eigenes Cluster. Da sich beide Cluster aber überlappen, deutet dies auf ähnliche mRNA-Expressionsprofile beider Gewebe hin. Demgegenüber zeigt das kompakte Cluster der Roux-Schenkel-Proben eine sehr deutliche Abgrenzung von Duodenum und Jejunum und weist somit auf einen deutlichen Unterschied im mRNA-Expressionsprofil des Roux-Schenkels gegenüber Duodenum und Jejunum hin. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass sich die intestinale mRNA-Expression im ersten Jahr nach einer RYGB-Operation verändert. Dieser Veränderung ist besonders deutlich am mRNA-Expressionsprofil des Roux-Schenkels zuerkennen, welches nicht mehr demjenigen des Jejunums entspricht, obwohl es sich beim Roux-Schenkel um ursprünglich jejunales Gewebe handelt.

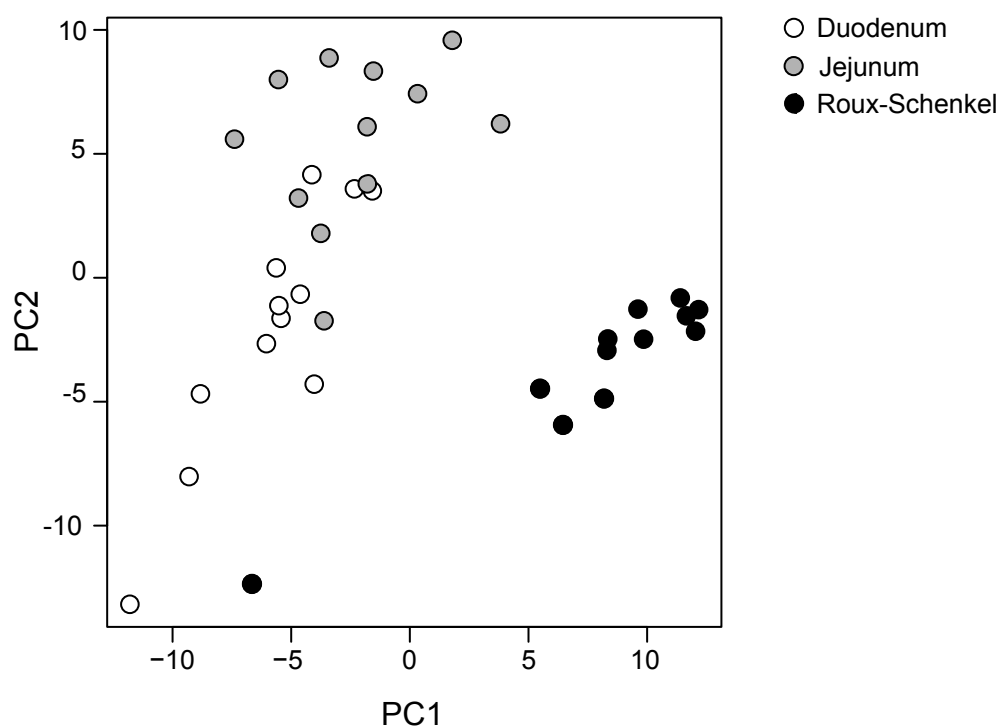


Abbildung 7 Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Expressionsdaten.

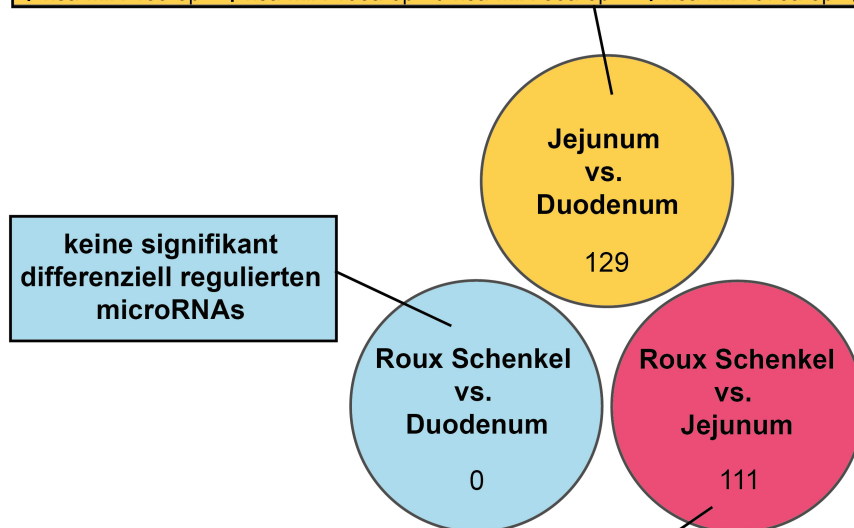
Jeder Kreis repräsentiert eine Probe. Die weißen Kreise stehen für die Proben aus dem Duodenum, die grauen für diejenigen aus dem Jejunum und die schwarzen für die aus dem Roux-Schenkel.

3.1.4 Analyse der microRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms

Neben dem Einfluss auf die mRNA-Expression sollte zusätzlich der Einfluss einer RYGB-Operation auf die Expression von microRNAs untersucht werden, die als posttranskriptionelle Regulatoren fungieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die microRNA-Expressionsprofile mittels TaqMan® Array Cards Pool A und B vermessen. Aufgrund der begrenzten Menge an Gesamt-RNA, die aus den einzelnen Biopsien isoliert werden konnte, standen für die Analyse der microRNA-Expression nur noch die Proben von elf Patienten zur Verfügung. Wie zuvor bei der Bestimmung der mRNA wurden ebenfalls zunächst die physiologischen microRNA-Expressionsprofile von Duodenum und Jejunum vor der Operation verglichen (Jejunum vs. Duodenum). Allerdings lag auch bei der Untersuchung der microRNA-Expressionsprofile das Hauptinteresse auf dem Vergleich des Roux-Schenkel-Gewebes mit dem Dünndarm vor der Operation (Roux-Schenkel vs. Duodenum und Roux-Schenkel vs. Jejunum). Von den 754 vermessenen microRNAs konnten insgesamt 342 detektiert werden und dienten als Grundlage für die weitere Datenauswertung. Nach statistischer Auswertung mittels Wilcoxon-Rang-Test und Korrektur des p-Wertes für multiples Testen (Benjamini-Hochberg-Prozedur), zeigten insgesamt 156 microRNAs signifikante Expressionsunterschiede (korrigierter p-Wert $p < 0,05$) in mindestens einem der drei Vergleiche (siehe Abbildung 8). Der Vergleich Jejunum vs. Duodenum zeigte 129 signifikant differenziell exprimierte microRNAs (Anhang, Tabelle 4, linke Spalte). Im Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum wurde hingegen interessanterweise keine einzige signifikant differenziell exprimierte microRNA identifiziert. Der Vergleich der Expressionsprofile von Roux-Schenkel und Jejunum wies wiederum 111 signifikant differenziell exprimierte microRNAs auf. (Anhang, Tabelle 4, rechte Spalte).

Einige der 156 identifizierten microRNAs zeigten in mehr als einem Vergleich eine differenzielle Regulation. Diese 77 microRNAs, die im Jejunum sowohl gegenüber dem Duodenum (Jejunum vs. Duodenum) als auch gegenüber dem Roux-Schenkel (Roux-Schenkel vs. Jejunum) eine differenzielle Expression aufwiesen und somit spezifisch das Jejunum charakterisieren, sind in Abbildung 9 dargestellt.

↑ hsa-let-7e	↑ hsa-miR-140-3p	↑ hsa-miR-19a	↑ hsa-miR-30a-5p	↑ hsa-miR-379	↑ hsa-miR-590-3p
↑ hsa-let-7f	↑ hsa-miR-140-5p	↑ hsa-miR-19b	↑ hsa-miR-30b	↑ hsa-miR-383	↑ hsa-miR-590-5p
↑ hsa-let-7g	↑ hsa-miR-143	↑ hsa-miR-195	↑ hsa-miR-30d	↑ hsa-miR-409-3p	↑ hsa-miR-598
↑ hsa-miR-1	↑ hsa-miR-144	↑ hsa-miR-197	↑ hsa-miR-30e-3p	↑ hsa-miR-410	↑ hsa-miR-628-3p
↑ hsa-miR-100	↑ hsa-miR-144-5p	↑ hsa-miR-199a-3p	↑ hsa-miR-320	↑ hsa-miR-411	↑ hsa-miR-655
↑ hsa-miR-101	↑ hsa-miR-145	↑ hsa-miR-199a-5p	↑ hsa-miR-324-3p	↑ hsa-miR-422a	↑ hsa-miR-708
↑ hsa-miR-10a-3p	↑ hsa-miR-145-3p	↑ hsa-miR-20b	↑ hsa-miR-331-3p	↑ hsa-miR-432	↑ hsa-miR-744-3p
↑ hsa-miR-10b	↑ hsa-miR-148b-5p	↑ hsa-miR-210	↑ hsa-miR-335	↑ hsa-miR-451	↑ hsa-miR-769-5p
↑ hsa-miR-10b-3p	↑ hsa-miR-149	↑ hsa-miR-21-5p	↑ hsa-miR-337-5p	↑ hsa-miR-454	↑ hsa-miR-9-3p
↑ hsa-miR-106a	↑ hsa-miR-151-5p	↑ hsa-miR-212	↑ hsa-miR-339-3p	↑ hsa-miR-454-5p	↑ hsa-miR-99a
↑ hsa-miR-1201	↑ hsa-miR-152	↑ hsa-miR-214	↑ hsa-miR-340	↑ hsa-miR-485-5p	↑ hsa-miR-93-3p
↑ hsa-miR-125a-5p	↑ hsa-miR-15a	↑ hsa-miR-214-5p	↑ hsa-miR-340-3p	↑ hsa-miR-486-5p	↑ hsa-miR-99b-3p
↑ hsa-miR-125b	↑ hsa-miR-15a-3p	↑ hsa-miR-218	↑ hsa-miR-342-3p	↑ hsa-miR-487b	↑ rno-miR-7-1-3p
↑ hsa-miR-126	↑ hsa-miR-16	↑ hsa-miR-222	↑ hsa-miR-345	↑ hsa-miR-489	↓ hsa-miR-1290
↑ hsa-miR-126-5p	↑ hsa-miR-17	↑ hsa-miR-24	↑ hsa-miR-34a-3p	↑ hsa-miR-491-5p	↓ hsa-miR-1300
↑ hsa-miR-1271	↑ hsa-miR-17-3p	↑ hsa-miR-26a-1-3p	↑ hsa-miR-362-3p	↑ hsa-miR-494	↓ hsa-miR-202
↑ hsa-miR-128	↑ hsa-miR-181a-2-3p	↑ hsa-miR-26b-3p	↑ hsa-miR-365	↑ hsa-miR-497	↓ hsa-miR-302c
↑ hsa-miR-133a	↑ hsa-miR-183	↑ hsa-miR-27a-5p	↑ hsa-miR-370	↑ hsa-miR-500	↓ hsa-miR-618
↑ hsa-miR-136-3p	↑ hsa-miR-184	↑ hsa-miR-27b-5p	↑ hsa-miR-374a	↑ hsa-miR-539	↓ hsa-miR-672
↑ hsa-miR-137	↑ hsa-miR-186	↑ hsa-miR-29a-5p	↑ hsa-miR-374b	↑ hsa-miR-542-3p	
↑ hsa-miR-138	↑ hsa-miR-191	↑ hsa-miR-301a	↑ hsa-miR-376c	↑ hsa-miR-545-5p	
↑ hsa-miR-139-5p	↑ hsa-miR-193a-5p	↑ hsa-miR-30a-3p	↑ hsa-miR-378a-3p	↑ hsa-miR-574-3p	



↑ hsa-miR-202	↓ hsa-miR-138	↓ hsa-miR-191	↓ hsa-miR-30a-5p	↓ hsa-miR-411	↓ hsa-miR-628-3p
↑ hsa-miR-302b	↓ hsa-miR-139-3p	↓ hsa-miR-193a-5p	↓ hsa-miR-30e-3p	↓ hsa-miR-424	↓ hsa-miR-769-5p
↑ hsa-miR-302c	↓ hsa-miR-139-5p	↓ hsa-miR-195	↓ hsa-miR-320	↓ hsa-miR-451	↓ hsa-miR-874
↓ hsa-miR-100	↓ hsa-miR-140-3p	↓ hsa-miR-197	↓ hsa-miR-323-3p	↓ hsa-miR-454	↓ hsa-miR-9-3p
↓ hsa-miR-101	↓ hsa-miR-140-5p	↓ hsa-miR-199a-3p	↓ hsa-miR-324-3p	↓ hsa-miR-454-5p	↓ hsa-miR-99a
↓ hsa-miR-103	↓ hsa-miR-143	↓ hsa-miR-199a-5p	↓ hsa-miR-328	↓ hsa-miR-455-5p	↓ rno-miR-29c-5p
↓ hsa-miR-10a	↓ hsa-miR-144	↓ hsa-miR-212	↓ hsa-miR-331-3p	↓ hsa-miR-484	
↓ hsa-miR-10a-3p	↓ hsa-miR-144-5p	↓ hsa-miR-21-3p	↓ hsa-miR-337-5p	↓ hsa-miR-486-5p	
↓ hsa-miR-10b	↓ hsa-miR-145	↓ hsa-miR-214	↓ hsa-miR-339-3p	↓ hsa-miR-487b	
↓ hsa-miR-10b-3p	↓ hsa-miR-145-3p	↓ hsa-miR-214-5p	↓ hsa-miR-340	↓ hsa-miR-491-5p	
↓ hsa-miR-1179	↓ hsa-miR-146a	↓ hsa-miR-218	↓ hsa-miR-34b	↓ hsa-miR-497	
↓ hsa-miR-125a-5p	↓ hsa-miR-146b-5p	↓ hsa-miR-222	↓ hsa-miR-34c-5p	↓ hsa-miR-500	
↓ hsa-miR-125b	↓ hsa-miR-148b-5p	↓ hsa-miR-223	↓ hsa-miR-342-3p	↓ hsa-miR-511	
↓ hsa-miR-126	↓ hsa-miR-149	↓ hsa-miR-223-5p	↓ hsa-miR-361-5p	↓ hsa-miR-539	
↓ hsa-miR-1271	↓ hsa-miR-15a	↓ hsa-miR-24	↓ hsa-miR-370	↓ hsa-miR-545	
↓ hsa-miR-127-3p	↓ hsa-miR-150	↓ hsa-miR-26a-1-3p	↓ hsa-miR-374a	↓ hsa-miR-574-3p	
↓ hsa-miR-130a	↓ hsa-miR-152	↓ hsa-miR-27a	↓ hsa-miR-374b	↓ hsa-miR-590-3p	
↓ hsa-miR-132	↓ hsa-miR-16	↓ hsa-miR-27b-5p	↓ hsa-miR-376c	↓ hsa-miR-590-5p	
↓ hsa-miR-133a	↓ hsa-miR-181a-2-3p	↓ hsa-miR-29a	↓ hsa-miR-379	↓ hsa-miR-592	
↓ hsa-miR-136-3p	↓ hsa-miR-185	↓ hsa-miR-301a	↓ hsa-miR-409-3p	↓ hsa-miR-598	
↓ hsa-miR-137	↓ hsa-miR-186	↓ hsa-miR-30a-3p	↓ hsa-miR-410	↓ hsa-miR-655	

Abbildung 8 Differenziell exprimierte microRNAs in den drei Gewebevergleichen.

Jeder Kreis steht für die im jeweiligen Vergleich differenziell exprimierte microRNAs. Die Pfeile stehen für eine Auf- bzw. Herabregulation der jeweiligen microRNA, wobei im Vergleich Roux-

Schenkel vs. Jejunum, das Jejunum als Referenz diente, während sich die Veränderung der Expression in den anderen beiden Vergleichen auf das Duodenum bezieht.

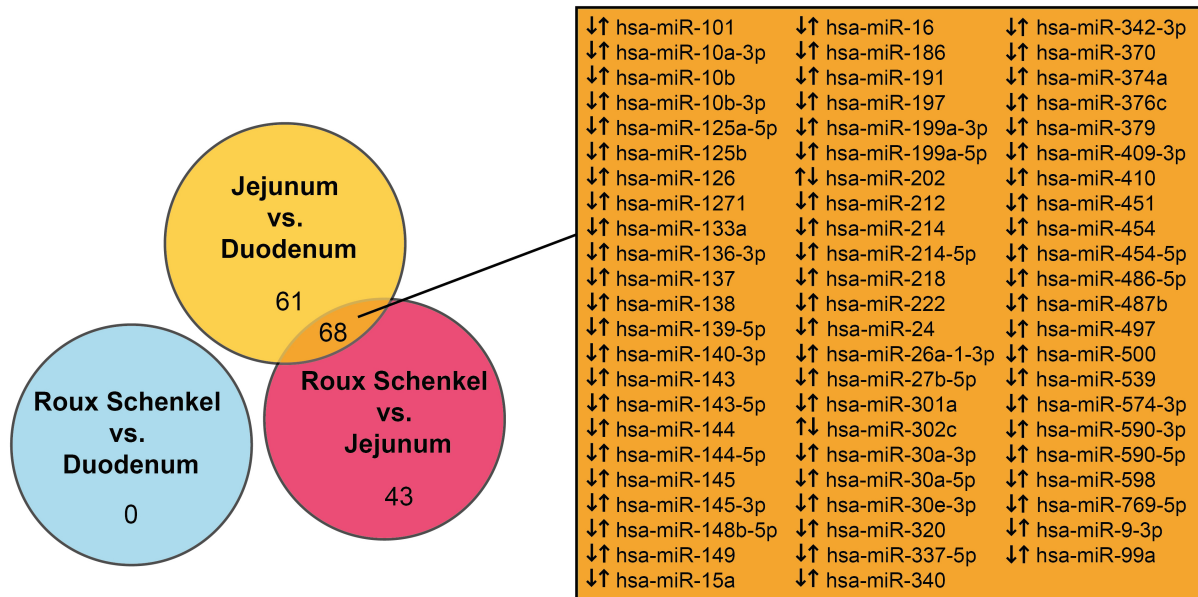


Abbildung 9 microRNAs, die in mehr als einem Gewebevergleich eine differenzielle Regulation aufwiesen. Das Venn-Diagramm basiert auf den 156 in den drei Vergleichen differenziell exprimierten microRNAs. Die Überlappungsfläche zeigt diejenigen microRNAs, die in mehr als einem Vergleich differenziell reguliert sind. Die Pfeile stehen für eine Auf- bzw. Herabregulation der jeweiligen microRNA, wobei sich die links stehenden Pfeile auf den Vergleich Jejunum vs. Duodenum beziehen und die rechts stehenden Pfeile auf den Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum.

3.1.5 Hauptkomponentenanalyse der differenziell exprimierten microRNAs

Für eine bessere Übersicht über die microRNA-Expressionsdaten wurde ebenfalls eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt, die auf den z-transformierten Expressionswerten der 156 differenziell exprimierten microRNAs basierte. Die ersten beiden Hauptkomponenten PC1 und PC2 erklären zusammen 82% der Varianz der einbezogenen microRNA-Expressionsdaten (siehe Abbildung 10). Die Proben aus Duodenum und Roux-Schenkel liegen jeweils in sehr kompakten Clustern zusammen und weisen somit sehr homogene gewebespezifische microRNA-Expressionsprofile auf. Demgegenüber zeigen die Proben aus dem Jejunum eine breite Streuung, welche auf eine stärkere Heterogenität in der microRNA-Expression dieser Proben hindeutet. Die Cluster von Duodenum und Roux-Schenkel überlagern sich vollständig. Dies weist auf eine sehr große Ähnlichkeit der microRNA-Expressionsprofile beider Gewebe hin. Demgegenüber ist trotz der breiten Streuung der jejunalen Proben zu erkennen, dass sich diese sowohl vom Duodenum, als auch vom Roux-Schenkel in ihren microRNA-Expressionsprofilen zum Teil stark

unterscheiden. Die auffälligen Unterschiede von Jejunum und Roux-Schenkel lassen somit den Schluss zu, dass sich die microRNA-Expression im jejunalen Gewebe über das erste Jahr nach der RYGB-Operation verändert.

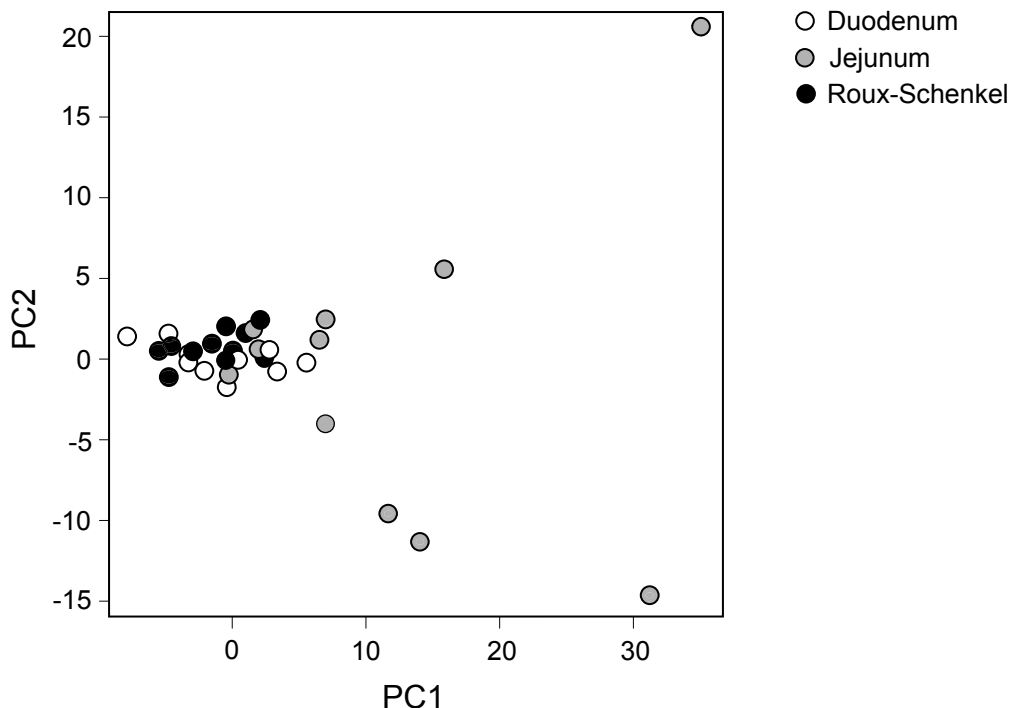


Abbildung 10 Hauptkomponentenanalyse der microRNA-Expressionsdaten.

Jeder Kreis repräsentiert eine Probe, die weißen Kreise stehen für die Proben aus dem Duodenum, die grauen für diejenigen aus dem Jejunum und die schwarzen für die aus dem Roux-Schenkel.

3.1.6 Jejunum vs. Duodenum - Untersuchung der physiologischen Ausgangssituation im oberen Dünndarm

Um physiologische Unterschiede zwischen Jejunum und Duodenum von adipösen Patienten zu erfassen, wurden zunächst die mRNA- und microRNA-Expressionsprofile dieser Gewebe miteinander verglichen. Auf mRNA-Ebene wurden, wie unter 3.1.2 beschrieben, 29 differenziell regulierte Gene identifiziert, von denen 27 Gene im Jejunum eine höhere und zwei eine niedrigere Expression als im Duodenum aufwiesen. Mit diesen 29 Genen wurde eine unüberwachte hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Diese stellte eine Alternative zur PCA dar und gruppierte die Gene und Proben entsprechend der Ähnlichkeit ihres Expressionsmusters. Die Ähnlichkeit (Distanz) der Proben kann anhand des Dendrogramms abgelesen werden, während die standardisierten Expressionswerte farbkodiert in der *heatmap* dargestellt sind. Abbildung 11 zeigt eine Überlappung der

Expressionsprofile von Jejunum und Duodenum und spiegelt somit die Beobachtung aus der PCA (siehe 3.1.3) wider. Diese Überlappung und die Tatsache, dass insgesamt nur 29 Gene eine differenzielle Expression aufwiesen, deuten auf eine große Ähnlichkeit zwischen Jejunum und Duodenum auf Ebene der mRNA-Expression hin.

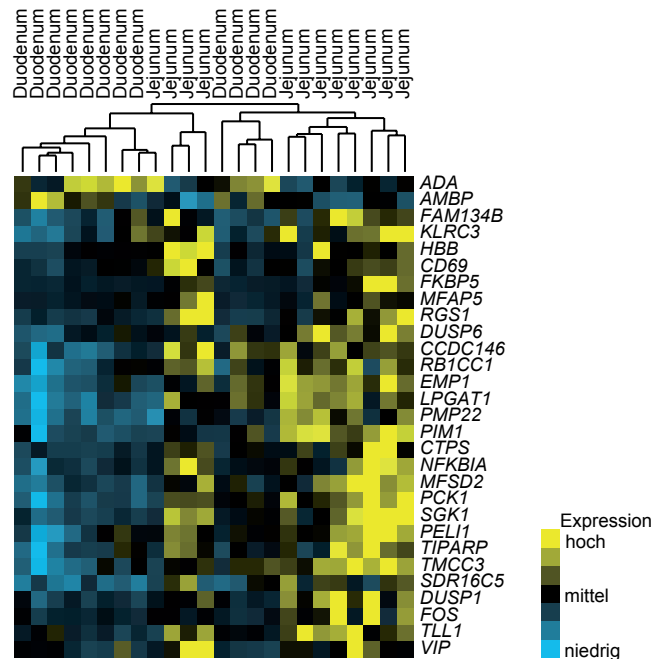


Abbildung 11 Jejunum und Duodenum weisen vor der RYGB-Operation ähnliche mRNA-Expressionsprofile auf. Die Clusteranalyse, die auf den z-transformierten Expressionswerten basiert, wurde mit der *average linkage* Methode und unter Verwendung der Spearman Rangkorrelation als Maß für die Ähnlichkeit durchgeführt. In der Farbkodierung der *heatmap* steht gelb für eine hohe, schwarz für eine mittlere und blau für eine niedrige Expression.

Um einen Hinweis zu erlangen, an welchen zellulären Prozessen diese differenziell exprimierten Gene beteiligt sein könnten, wurde eine Überrepräsentationsanalyse durchgeführt (siehe 2.2.7.5). In dieser Analyse wurde untersucht, welche GO (*Gene Ontology*)-Terme unter den untersuchten Genen überrepräsentiert sind. In der Analyse wurden diejenigen GO-Terme der Kategorie „Biologische Prozesse“ als relevant erachtet, die einen p-Wert < 0,05 und eine FDR < 1% aufwiesen. Insgesamt wurden 28 überrepräsentierte GO-Terme identifiziert (siehe Anhang: Tabelle 5). In Abbildung 12 sind die überrepräsentierten GO-Terme entsprechend ihrer Ähnlichkeit untereinander dargestellt, wobei redundante Terme für eine bessere Übersichtlichkeit zusammengefasst wurden. Diese Analyse zeigt, dass sich Jejunum und Duodenum der stark adipösen Patienten insbesondere in der Expression von Genen

unterscheiden, welche an der Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies, also auf oxidativen Stress und an Prozessen der Proteinmodifikation beteiligt sind.

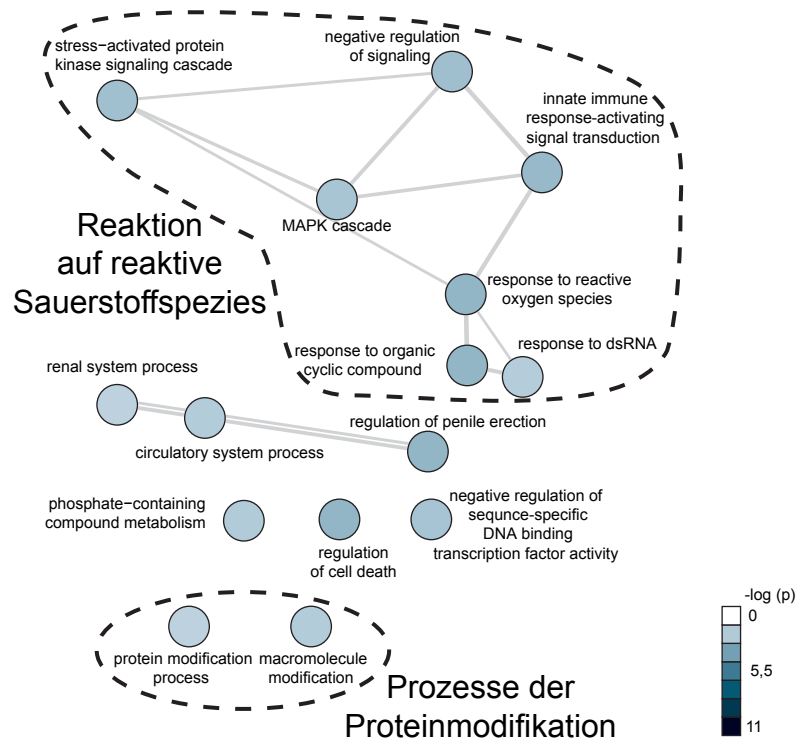


Abbildung 12 Überrepräsentierte GO-Terme - Jejunum vs. Duodenum.

Die überrepräsentierte GO-Terme der Kategorie „Biologische Prozesse“ sind für die 29 differenziell exprimierten Gene (p -Wert $< 0,05$; FDR $< 1\%$) gezeigt. Hier wurden die englischen Termmamen verwendet, da es keine offizielle deutsche Übersetzung gibt, und diese den GO-Identifikatoren eindeutig zugeordnet werden können. Der p -Wert ist als $-\log(p)$ dargestellt und die Blaustufen der Knoten repräsentieren die p -Werte, wobei dunkleres Blau auf kleinere p -Werte hinweist. Die gestrichelte Umrahmung fasst jeweils GO-Terme zusammen, die übergeordneten Prozessen zugeordnet werden können.

Neben den Unterschieden in der mRNA-Expression wurden 129 microRNAs identifiziert, welche zwischen Jejunum und Duodenum der stark adipösen Patienten eine differenzielle Expression aufwiesen (siehe 3.1.4). Dabei zeigten im Jejunum 123 microRNAs eine höhere und 6 eine niedrigere Expression als im Duodenum. Um Hinweise zu erlangen, ob die identifizierten microRNAs an der Regulation der 29 differenziell exprimierten mRNA beteiligt sein könnten, wurde eine Korrelationsanalyse und eine *in-silico* Zielgen-Vorhersage durchgeführt. Die Expressionsdaten der 29 differenziell exprimierten mRNAs wurden mit denen der 129 differenziell exprimierten microRNAs unter Anwendung der Spearman Rangkorrelation korreliert. Es ergaben sich insgesamt 3741 Rangkorrelationskoeffizienten, von denen 210 auf eine signifikant negative Korrelation hinwiesen (siehe Abbildung 13).

Zudem wurde eine *in-silico* Zielgen-Vorhersage mit Hilfe verschiedener Datenbanken durchgeführt, um potentielle microRNA-mRNA-Interaktionen zu identifizieren. Für diese Analyse wurden die Datenbanken TargetScan, DIANA-micro T-CDS und MicroCosm Targets (siehe 2.3.2) verwendet. Da die jeweiligen Algorithmen der Datenbanken die unterschiedlichen Eigenschaften wie Komplementarität der *seed*-Region, Vorhandensein konservierter Bereiche, freiwerdende Energie oder Erreichbarkeit der Bindesequenz unterschiedlich stark bewerten, wurden nur diejenigen microRNA-mRNA-Paare als potentiell interessant erachtet, die von allen drei Datenbanken vorhergesagt wurden. Des Weiteren wurde die Datenbank miRWalk 2.0 verwendet, um nach validierten microRNA-mRNA-Interaktionen zu suchen.

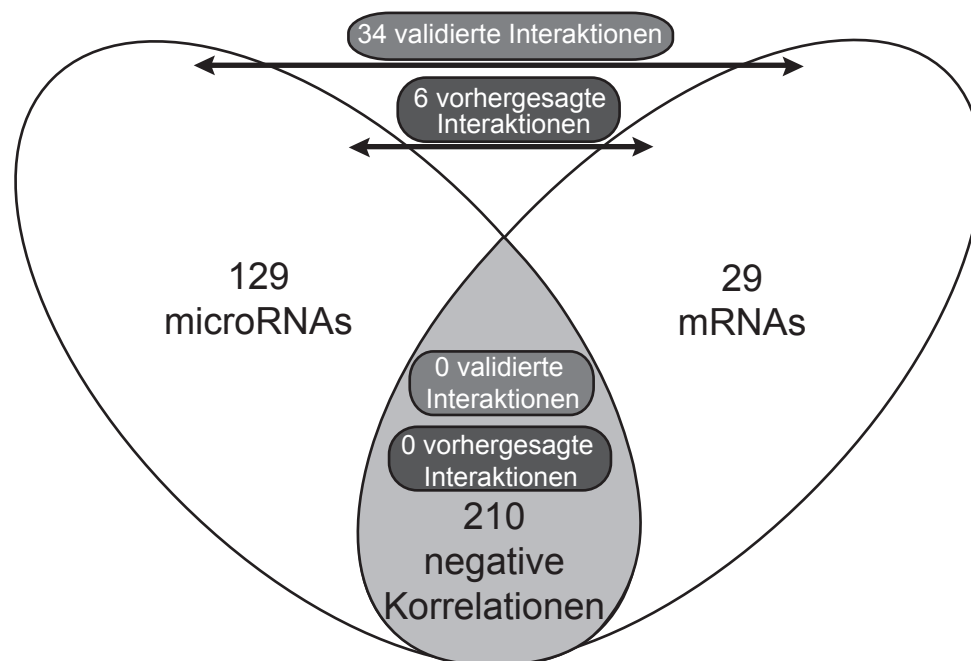


Abbildung 13 Validierte und zusätzlich vorhergesagte Interaktionen der differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs - Jejunum vs. Duodenum. Die vorhergesagten Interaktionen wurden von TargetScan, Diana-micro T-CDS und MicroCosm Targets vorhergesagt. Die validierten Interaktionen wurden miRWalk 2.0 entnommen.

Zwischen den 29 mRNAs und 129 microRNAs wurden 34 validierte und weitere sechs vorhergesagte Interaktionen identifiziert. Allerdings zeigte keines dieser microRNA-mRNA-Paare zusätzlich eine negative Korrelation. Für diejenigen 210 microRNA-mRNA-Paare, die eine signifikant negative Korrelation aufwiesen, wurden wiederum keine Interaktionen vorhergesagt. Zusammengefasst lassen diese

Daten keinen Schluss auf Interaktionen zwischen den differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs im Vergleich Jejunum vs. Duodenum zu.

3.1.7 Roux-Schenkel vs. Duodenum – Löst eine Veränderung der anatomischen Position im Darm Adaptationsprozesse aus?

Im zweiten Vergleich wurden die mRNA- und microRNA-Expressionsprofile des Roux-Schenkels mit denen des Duodenums vor RYGB verglichen. Durch diesen Vergleich sollte untersucht werden, ob die veränderte anatomische Position des Roux-Schenkels im oberen Gastrointestinaltrakt nach einem Jahr zu Adaptationsprozessen auf molekularer Ebene führen kann.

Auf mRNA-Ebene wurden in diesem Vergleich zwei verschiedene Beobachtungen gemacht. Unter physiologischen Bedingungen zeigten Jejunum und Duodenum (siehe 3.1.6) 29 differenziell exprimierte mRNAs. Von diesen 29 mRNAs wiesen allerdings in dem Vergleich von Roux-Schenkel, der aus dem Jejunum geformt wurde, mit dem Duodenum nur noch drei mRNAs entsprechende Expressionsunterschiede auf (siehe Abbildung 6A). Die Expressionswerte der übrigen 26 Gene des Roux-Schenkels scheinen sich somit an diejenigen des Duodenums adaptiert zu haben.

Auf der anderen Seite zeigten insgesamt 86 mRNAs zwischen Roux-Schenkel und Duodenum Expressionsunterschiede (68 heraufreguliert und 18 herunterreguliert), die zwischen Jejunum und Duodenum vor der Operation nicht auftraten (siehe 3.1.6). Das Ergebnis einer hierarchischen Clusteranalyse dieser 86 differenziell exprimierten mRNAs ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Proben beider Gewebe bilden, wie in der PCA unter 3.1.3 bereits zu erkennen, zwei separate Gruppierungen. Eine einzige Roux-Schenkel-Probe wurde als Ausreißer identifiziert, welche mit den Proben aus dem Duodenum clustert. Zusammengenommen deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass sich der Roux-Schenkel dem Duodenum im Bezug auf Gene, welche mit oxidativem Stress und Prozessen der Proteinmodifikation assoziiert sind, anzugleichen scheint. Zusätzlich weisen aber andere Gene auf deutliche Expressionsunterschiede zwischen beiden Geweben hin.

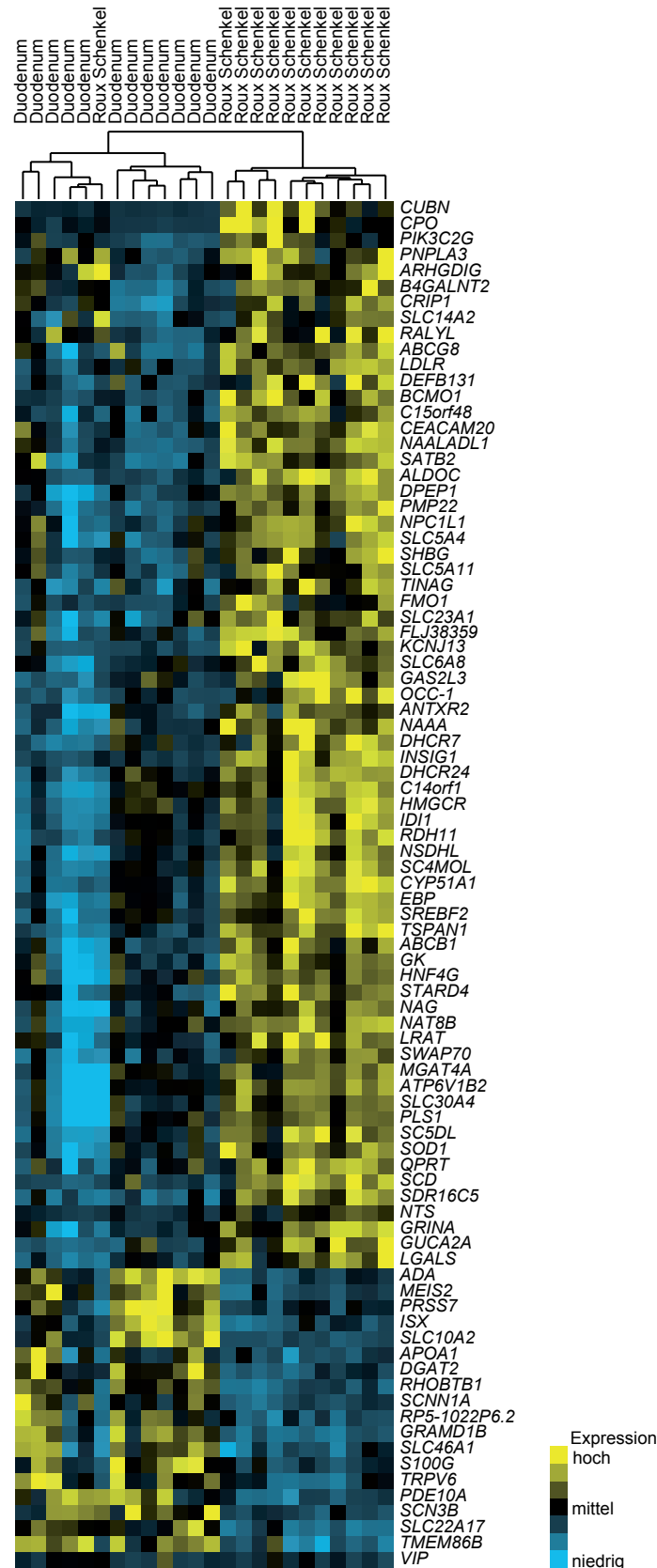


Abbildung 14 Roux-Schenkel und Duodenum unterscheiden sich deutlich in ihren mRNA-Expressionsprofilen. Die Clusteranalyse, die auf den z-transformierten Expressionswerten basiert, wurde mit der *average linkage* Methode und unter Verwendung der Spearman Rangkorrelation als

Maß für die Ähnlichkeit durchgeführt. In der Farbkodierung der *heatmap* steht gelb für eine hohe, schwarz für eine mittlere und blau für eine niedrige Expression.

Um diese zwischen Roux-Schenkel und Duodenum differenziell exprimierte Gene biologischen Prozessen zuordnen zu können, wurde auch für diesen Vergleich eine Überrepräsentationsanalyse durchgeführt (siehe 3.1.6). Insgesamt wurden 48 überrepräsentierte GO-Terme identifiziert (siehe Anhang: Tabelle 6), die in Abbildung 15 entsprechend der Ähnlichkeit der GO-Terme bzw. Prozesse untereinander dargestellt sind. Die Ergebnisse dieser Analyse legen nahe, dass sich Roux-Schenkel und Duodenum besonders in der Expression von Genen unterscheiden, die an metabolischen Prozessen beteiligt sind. Eine besondere Überrepräsentation wurde von Genen identifiziert, die am Fettverdau, an der Lipidsynthese, am Steroid- und Alkoholmetabolismus sowie an Transportprozessen beteiligt sind.

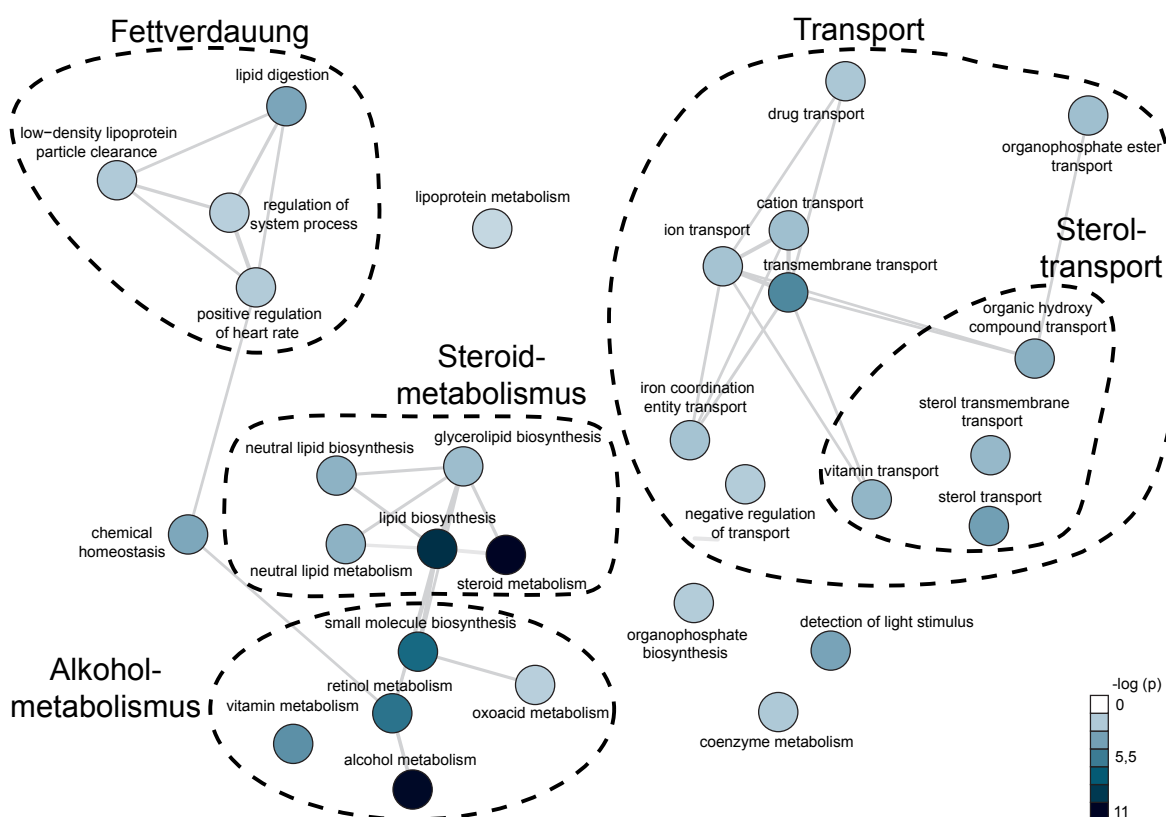


Abbildung 15 Überrepräsentierte GO-Terme - Roux-Schenkel vs. Duodenum.

Die überrepräsentierten GO-Terme der Kategorie „Biologische Prozesse“ sind für die 86 differenziell exprimierte Gene (p -Wert $< 0,05$; FDR $< 1\%$) dargestellt. Hier wurden die englischen Termini verwendet, da es keine offizielle deutsche Übersetzung gibt, und diese den GO-Identifikatoren eindeutig zugeordnet werden können. Der p -Wert ist als $-\log(p)$ dargestellt und die Blaustufen der Knoten repräsentieren die p -Werte, wobei dunkleres Blau auf kleinere p -Werte hinweist. Die gestrichelte Umrahmung fasst jeweils GO-Terme zusammen, die übergeordneten Prozessen zugeordnet werden können.

In diesem Vergleich von Roux-Schenkel und Duodenum zeigte sich auf microRNA-Ebene interessanterweise ein deutlich anderes Bild als für die mRNAs. Während sich die microRNA-Expressionsprofile zwischen Jejunum und Duodenum vor der RYGB-Operation unterschieden (3.1.6), konnte keine differenzielle microRNA-Expression zwischen dem Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB und dem Duodenum vor RYGB identifiziert werden. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass sich die microRNA-Expression im jejunalen Gewebe während des einen Jahres nach der Operation dahingehend verändert hat, dass es sich dem Expressionsprofil des Duodenums angleich.

3.1.8 Roux-Schenkel vs. Jejunum – Führt ein RYGB zu Adaptationsprozesse im jejunalen Gewebe?

Das Hauptinteresse dieser Arbeit lag in dem Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum, da dieser Vergleich Einblicke in die molekularen Adaptationsprozesse erlaubte, die im jejunalen Gewebe im ersten Jahr nach der RYGB-Operation ablaufen. Die Proben aus Roux-Schenkel und Jejunum entstammen ursprünglich demselben Gewebe, so dass sämtliche Unterschiede in mRNA- und microRNA-Expressionsprofilen auf die veränderten Einflüsse durch die RYGB-Operation zurückzuführen sein sollten.

Auf mRNA-Ebene wurden in diesem Vergleich 68 differenziell exprimierte Transkripte identifiziert (siehe 3.1.2), von denen im Roux-Schenkel 24 eine höhere und 44 eine niedrigere Expression als im Jejunum aufwiesen. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis der Clusteranalyse der differenziell exprimierten mRNAs. Die Proben aus beiden Geweben bilden zwei separate, deutlich voneinander abgegrenzte Gruppierungen, ebenso wie in der PCA (3.1.3). Dies deutet darauf hin, dass die RYGB-Operation zu einer Veränderung des mRNA-Expressionprofils des jejunalen Gewebes innerhalb eines Jahres nach der Operation führt.

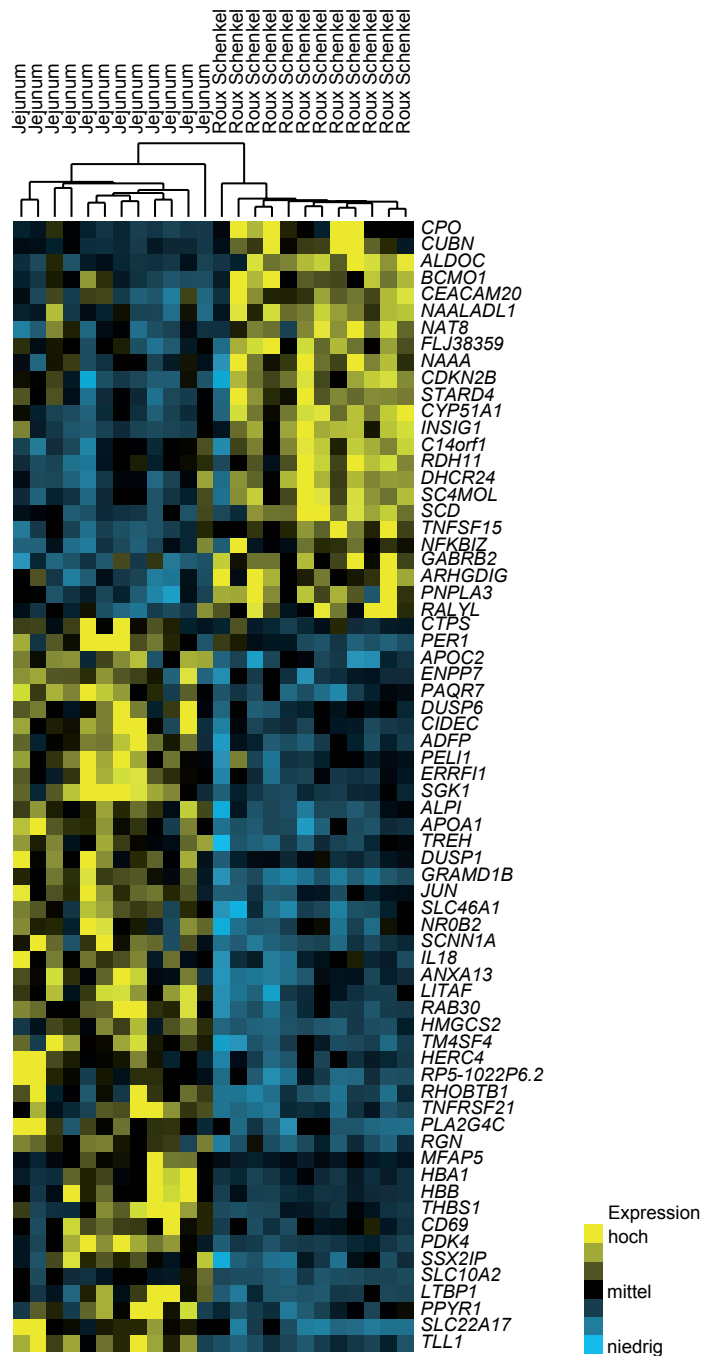


Abbildung 16 Roux-Schenkel und Jejunum weisen deutliche Unterschiede in ihren mRNA-Expressionsprofilen auf. Die Clusteranalyse, die auf den z-transformierten Expressionswerten basiert, wurde mit der *average linkage* Methode und unter Verwendung der Spearman Rangkorrelation als Maß für die Ähnlichkeit durchgeführt. In der Farbkodierung der *heatmap* steht gelb für eine hohe, schwarz für eine mittlere und blau für eine niedrige Expression.

Um einen Überblick zu erlangen an welchen Stoffwechselwegen die 68 differenziell exprimierten mRNAs beteiligt sind, wurde auch für diese Gene eine Überrepräsentationsanalyse (siehe 3.1.6) durchgeführt. Insgesamt wurden 70 überrepräsentierte GO-Terme identifiziert (siehe Abbildung 17 und Anhang, Tabelle 7).

Der Roux-Schenkel und das Jejunum unterscheiden sich insbesondere in der Expression von Genen, die an metabolischen Prozessen beteiligt sind. So sind insbesondere Gene der Lipidsynthese, sowie des Alkohol-, Steroid- und Vitaminmetabolismus, ebenso wie solche mit Beteiligung an Transportprozessen und deren Regulation überrepräsentiert. Desweiteren zeigen Gene eine Überrepräsentation, die mit der Reaktion auf organische Substanzen assoziiert sind. Insgesamt ähneln diese überrepräsentierten Prozesse denen aus dem Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum.

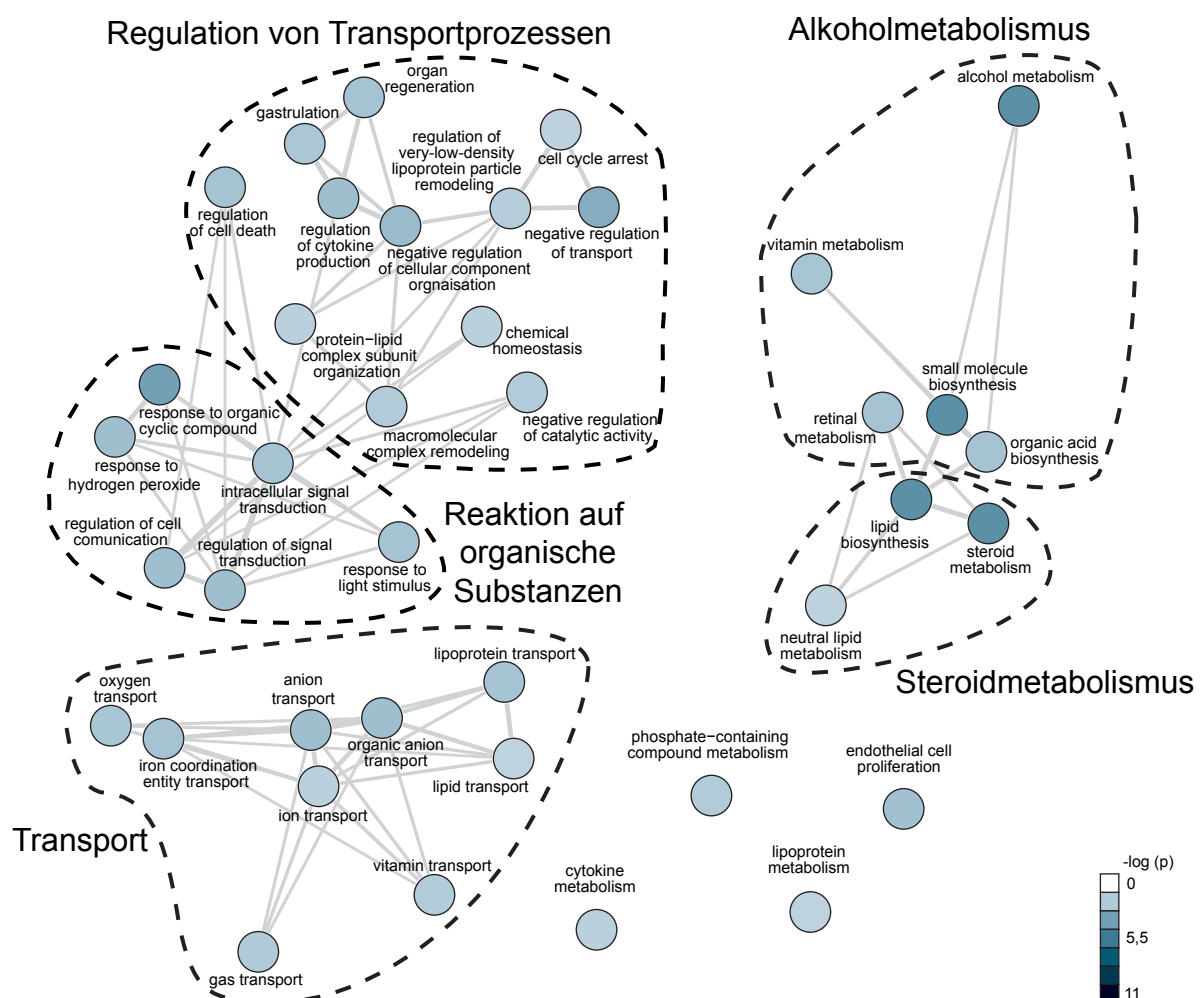


Abbildung 17 Überrepräsentierte GO-Terme - Roux-Schenkel vs. Jejunum.

Die überrepräsentierten GO-Terme der Kategorie „Biologische Prozesse“ sind für die 68 differenziell exprimierten Gene (p -Wert $< 0,05$; FDR $< 1\%$) dargestellt. Hier wurden die englischen Termmamen verwendet, da diese den GO-Identifikatoren eindeutig zugeordnet werden können. Der p -Wert ist als $-\log(p)$ dargestellt und die Blaustufen der Knoten repräsentieren die p -Werte, wobei dunkleres Blau auf kleinere p -Werte hinweist. Die gestrichelte Umrahmung fasst jeweils GO-Terme zusammen, die übergeordneten Prozessen zugeordnet werden können.

Der Roux-Schenkel und das Jejunum zeigten zusätzlich zu den 68 mRNAs auch 111 differenziell exprimierte microRNAs, von denen drei im Roux-Schenkel höher und 108 niedriger exprimiert waren als im Jejunum (siehe 3.1.4). Die computergestützte Zielgen-Vorhersage mittels TargetScan, DIANA-micro T-CDS und MicroCosm Targets identifizierte zwischen den 68 differenziell exprimierten mRNAs und den 111 microRNAs 27 validierte und weitere 24 vorhergesagte Interaktionen. Allerdings zeigte in den vorliegenden Proben keines dieser microRNA-mRNA-Paare eine signifikant negative Korrelation (siehe Abbildung 18). Die Korrelationsanalyse ergaben aber insgesamt 1608 signifikant negative Korrelationen ($p < 0,05$), unter denen insgesamt 12 weitere microRNA-mRNA-Paare identifiziert wurden. Für neun von diesen Paaren waren die Interaktionen bereits validiert und für die restlichen drei vorhergesagt. Dieses Ergebnis kann als Hinweis betrachtet werden, dass die jejunalen mRNAs einer posttranskriptionellen Regulation durch die entsprechenden microRNAs unterliegen könnten.

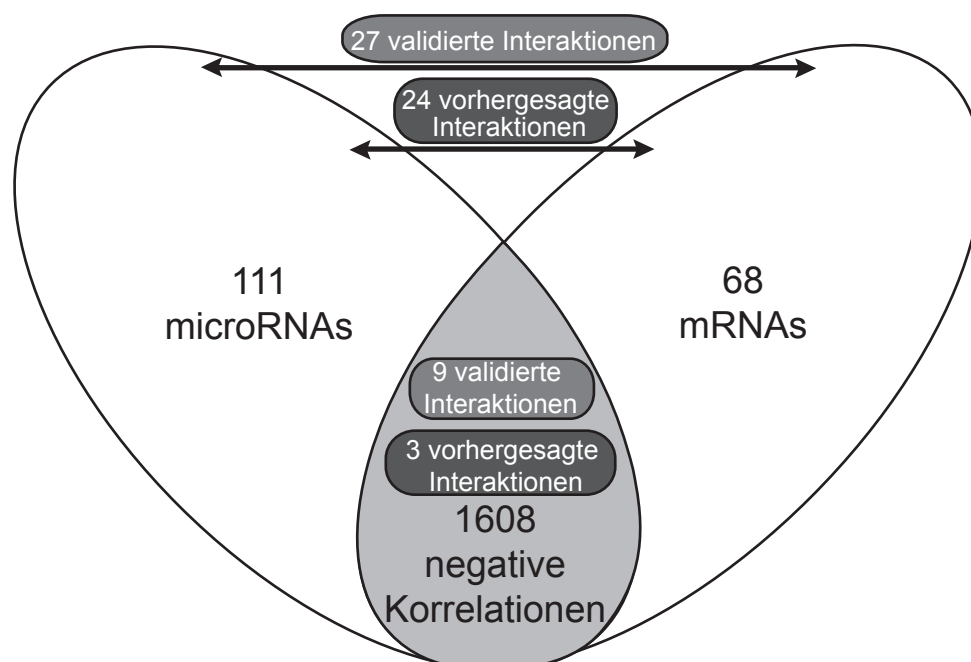


Abbildung 18 Validierte und zusätzlich vorhergesagte Interaktionen der differenziell exprimierten mRNAs und microRNAs - Roux-Schenkel vs. Jejunum. Die vorhergesagten Interaktionen wurden von TargetScan, Diana-micro T-CDS und MicroCosm Targets vorhergesagt. Die validierten Interaktionen wurden mirWalk 2.0 entnommen.

Bei den neun validierten Interaktionen handelte es sich vor allem um solche zwischen microRNAs und Genen des Energiestoffwechsels. *SCD*, welches für die Stearoyl-CoA-Reduktase kodiert, die insbesondere an der Synthese von Ölsäure beteiligt ist ¹⁶⁰, gilt als validiertes Zielgen von miR-149-5p ¹⁶¹, miR-181a-5p ¹⁶², miR-185-5p ¹⁶¹, miR-30a-5p ¹⁶³ und miR-331-3p ¹⁶¹. Für *INSIG1* (*insulin induced gene 1*), dessen Genprodukt an der Regulation der Cholesterolumöostase beteiligt ist, wurde gezeigt, dass miR-100-5p ¹⁶¹ an dessen 3'-UTR bindet. Für *DHCR24*, dessen Protein einen Teilschritt der Cholesterolsynthese katalysiert, wurden Interaktionen mit miR-24-3p ¹⁶⁴ und miR-484 ¹⁶¹ beschrieben. Auch für *RDH11*, welches bei der Vitamin A Synthese involviert ist, wurde bereits eine Interaktion mit miR-590-3p ¹⁶² gezeigt. Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass im Zusammenhang mit einer RYGB-Operation insbesondere Teile des jejunalen Energiestoffwechsels einer posttranskriptionellen Regulation durch microRNAs zu unterliegen scheinen.

3.1.8.1 Vorhergesagte Regulation von *BCMO1* durch microRNAs

Bei den drei vorhergesagten Interaktionen, die eine signifikant negative Korrelation aufwiesen, handelte es sich um drei microRNAs einer Familie (miR-130a, miR-301a und miR-454), die alle die 3'-UTR des Schlüsselenzyms der Vitamin A Synthese, der β -Caroten 15,15'-Monooxygenase 1 (*BCMO1*), binden sollten. Die Bindung wurde von allen drei verwendeten Datenbanken im Bereich der Basen 77-100 der *BCMO1*-3'-UTR Sequenz vorhergesagt. Die signifikant negativen Korrelationskoeffizienten der drei Paare lagen für *BCMO1* - miR-130a bei $r = -0,460$ ($p = 0,031$), für *BCMO1* - miR-301a bei $r = -0,532$ ($p = 0,012$) und für *BCMO1* - miR-454 bei $r = -0,561$ ($p = 0,007$) (siehe Abbildung 19). Zusammengenommen geben die Ergebnisse von Korrelationsanalyse und Zielgen-Vorhersage einen guten Anhaltspunkt dafür, dass tatsächlich eine Interaktion zwischen microRNA und mRNA vorliegen könnte. Desweiteren ist es sehr interessant, dass für *RDH11*, ein weiteres Gen der Vitamin A Synthese, eine signifikant negative Korrelation mit der validierten microRNA miR-590-3p in diesem Vergleich gefunden wurde. Außerdem legen Hinweise aus der Literatur nahe, dass Vitamin A einen entscheidenden Einfluss auf intestinale Adaptationsprozesse bei Kurzdarm-Syndrom hat ⁹⁰⁻⁹², wobei ein entsprechender Zusammenhang nach einer RYGB-Operation noch nicht untersucht

wurde. Vor diesem Hintergrund sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die potentielle Interaktion von *BCMO1* mit miR-130a, miR-301a und miR-454 und der Effekt auf den *BCMO1*-Proteingehalt näher untersucht werden (siehe 3.2-3.4).

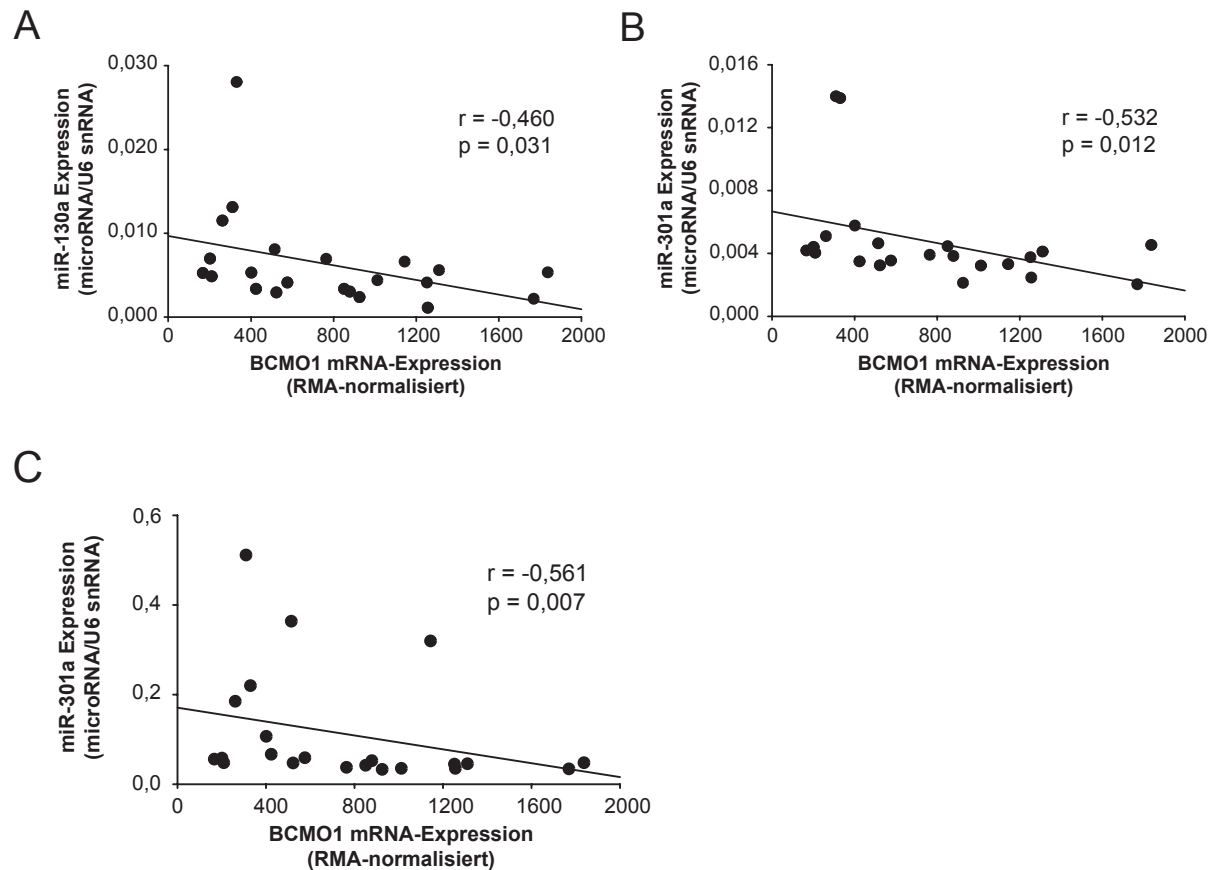


Abbildung 19 Korrelation der *BCMO1*-mRNA mit der Expression von (A) miR-130a, (B) miR-301a und (C) miR-454. Datengrundlage für die Spearman Rangkorrelation waren RMA (*robust multi-array average* Methode) normalisierte Expressionswerte von *BCMO1*, bzw. die auf U6 snRNA normalisierten Expressionswerte der microRNAs, jeweils aus Roux-Schenkel und Jejunum.

3.2 Validierung der mRNA-Expression ausgewählter Kandidatengene

Da in dieser Arbeit insbesondere die mukosalen Adaptations- / Veränderungsprozesse nach RYGB untersucht werden sollten, wurden für die Validierung der Microarray-Ergebnisse insbesondere solche Gene ausgewählt, die im Roux-Schenkel entweder gegenüber Duodenum, gegenüber Jejunum oder gegenüber beiden differenziell reguliert waren. Eine Validierung der Microarray-Ergebnisse ist notwendig, da infolge der großen Anzahl an vermessenen mRNAs und der damit verbundenen statistischen Auswertung die Gefahr besteht, eine größere Anzahl an falsch positiven Ergebnissen zu erhalten. Um sicher zu gehen, dass es sich um einen tatsächlichen Expressionsunterschied handelt, hat es sich durchgesetzt die Ergebnisse eines solchen *screenings* mittels einer zweiten Methode individuell zu verifizieren, in diesem Fall mittels qRT-PCR. Die 26 ausgewählten Gene lassen sich zum Großteil den besonders überrepräsentierten biologischen Prozessen wie Steroid- und Vitaminmetabolismus sowie Transportprozessen zuordnen. Zusätzlich wurde die Expression 17 weiterer Gene mittels qRT-PCR überprüft, die in der Microarray-Analyse zwar keine differenzielle Regulation aufwiesen, aber in einem sehr nahen funktionellen Zusammenhang mit den 26 ausgewählten Kandidatengenen stehen. Alle qRT-PCR-Messungen des Validierungsexperiments basieren auf den 36 Gewebeproben der zwölf RYGB-Patienten. Die Ergebnisse des Validierungsexperiments sind in folgender Reihenfolge aufgeführt: Gene, die an Cholesterolabsorption, Cholesterolbioynthese und Regulation der Cholesterolhomöostase beteiligt sind; Gene des Kohlenhydratstoffwechsels; Gene, die für Darmhormone kodieren; Gene, welche an Transportprozessen wie Arzneistofftransport und Absorption von Vitaminen und Mikronährstoffen beteiligt sind, und zuletzt die Gene der Vitamin A Synthese.

3.2.1 Ermittlung einer geeigneten endogenen Kontrolle für die qRT-PCR

Da es sich bei der verwendeten qRT-PCR-Methode um eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression handelte, musste zunächst eine geeignete endogene Kontrolle identifiziert werden, die über alle drei Gewebearten, die verglichen werden sollten, eine gleichmäßige Expression aufwies (siehe 2.2.7.8). Zu diesem Zweck wurde die Expression von 16 Genen, die potentiell als endogene Kontrollen geeignet

sein könnten, in 16 Gewebeproben (sechs aus dem Duodenum und jeweils fünf aus Jejunum und Roux-Schenkel) gemessen. Um dasjenige Gen mit der stabilsten Expression über alle drei Gewebearten zu identifizieren, wurde für die Expressionswerte pro Gen jeweils der Median und der Interquartilabstand auf Grundlage aller gemessenen Ct-Werte berechnet (siehe Abbildung 20). Dabei erwies sich *18S* als dasjenige Gen mit den geringsten Schwankungen in der Expression. Somit wurde *18S* für die Validierung der mRNA-Expression der Kandidatengene als endogene Kontrolle ausgewählt.

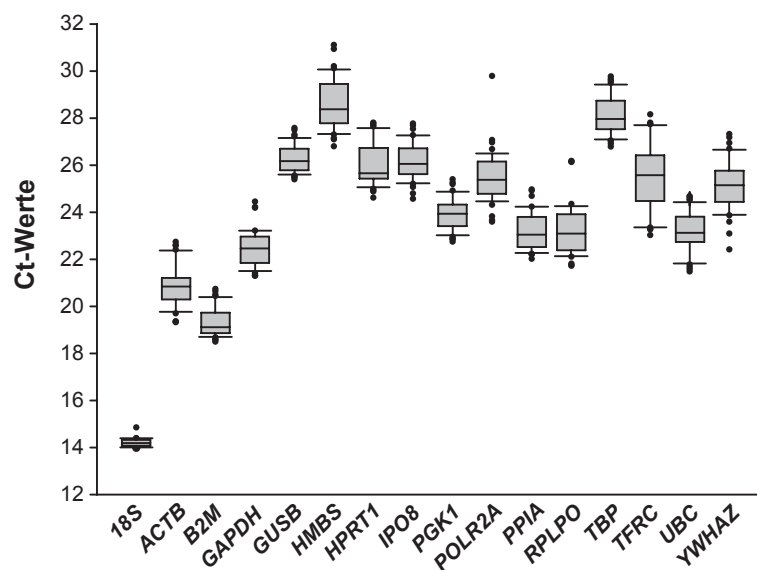


Abbildung 20 mRNA-Expression potentieller endogener Kontrollen.

Die in den 16 Gewebeproben gemessenen Ct-Werte der 16 potentiellen endogenen Kontrollen sind in dem Boxplot als Median mit Interquartilabstand dargestellt.

3.2.2 Gene der intestinalen Fettverdauung und –absorption

Zehn Kandidatengene, die mit den intestinalen Prozessen der Fettverdauung und –absorption assoziiert sind, wurden im qRT-PCR-Experiment validiert. Abbildung 21 zeigt eine Modifikation der KEGG *Pathway* Karte „*fat digestion and absorption*“ (map04975) ¹⁶⁵, in der nur diejenigen Gene aufgeführt sind, deren Expression in der vorliegenden Arbeit verifiziert wurde. In Abbildung 22 sind für jedes dieser Gene sowohl die normalisierten Expressionswerte der Microarray-Analysen, als auch der qRT-PCR-Analysen dargestellt; zusätzlich enthält Tabelle 4 die *fold changes* der qRT-PCR-Analyse sowie die korrigierten p-Werte.

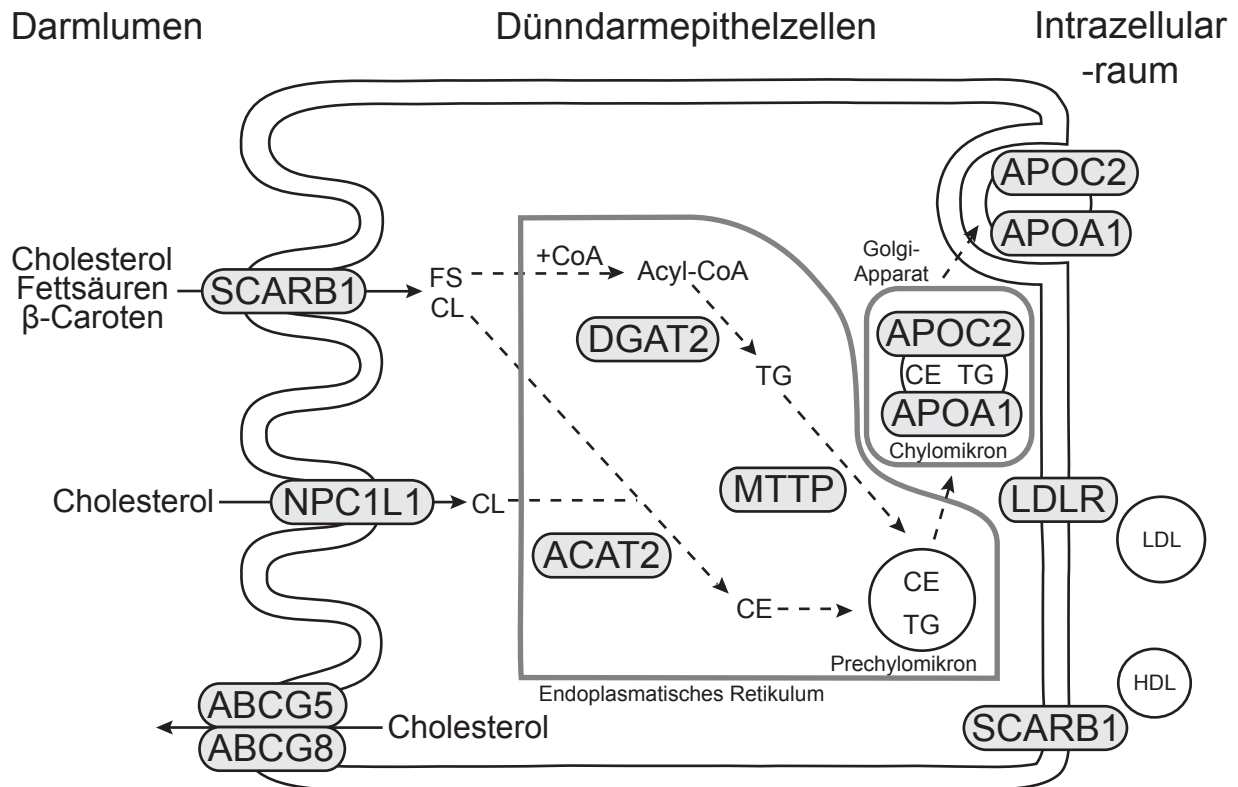


Abbildung 21 Modifizierte KEGG Pathway Karte „fat digestion and absorption“ (map04975)
 CL = Cholesterin, CE = Cholesterolester, FS = Fettsäure, TG = Triglycerid, LDL = low density lipoprotein, HDL = high density lipoprotein.

Für den Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum vor RYGB wiesen acht der zehn Gene in der qRT-PCR-Analyse signifikante Expressionsunterschiede auf. Sowohl Gene, die für Transportproteine kodieren, die an der Aufnahme von Cholesterin beteiligt sind (*NPC1L1*, *SCARB1*), als auch *ABCG5* und *ABCG8*, deren Proteine die Cholesterinabsorption limitieren¹⁶⁶, zeigten im Roux-Schenkel höhere Expressionswerte als im Duodenum. Desweiteren wiesen *ACAT2*, dessen Genprodukt durch Veresterung das Cholesterin in seine Speicher-/Transportform überführt¹⁶⁷, sowie *MTTP*, dessen Protein unter anderem den Transfer von Cholesterolestern in Plasmalipoproteine katalysiert¹⁶⁸, im Roux-Schenkel erhöhte mRNA-Expressionswerte im Vergleich zum Duodenum auf. *LDLR*, das für den low density lipoprotein receptor kodiert, der für die Cholesterinaufnahme aus dem Blut verantwortlich ist¹⁶⁹, zeigte im Roux-Schenkel ebenfalls höhere Expressionswerte als im Duodenum. Einzig die *Diacylglycerol-O-Acyltransferase* (*DGAT2*), deren Protein die Bildung von Triglyceriden katalysiert¹⁷⁰, war im Roux-Schenkel niedriger exprimiert als im Duodenum.

Im jejunalen Gewebe zeigten über das erste Jahr nach RYGB (Roux-Schenkel vs. Jejunum) nur zwei dieser Gene Expressionsunterschiede. Der Roux-Schenkel wies im Vergleich zum Jejunum für *ACAT2* signifikant höhere Expressionswerte auf, während die Expression von *APOC2*, dessen Protein unter anderem einen Bestandteil der Chylomikonen darstellt, signifikant niedriger war. Für *APOA1*, welches für das Apolipoprotein A1 kodiert, konnten in der qRT-PCR-Analyse in keinem der beiden Vergleiche (Roux-Schenkel vs. Duodenum, Roux-Schenkel vs. Jejunum) die im Microarray-Experiment detektierten Expressionsunterschiede bestätigt werden.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass im Roux-Schenkel vor allem im Vergleich zum Duodenum vor RYGB eine erhöhte Cholesterolaufnahme und Speicherung stattfindet.

Tabelle 4 Gene der intestinalen Fettverdauung und-absorption – qRT-PCR

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gensymbol	Genname	fold change^a	p-Wert^b
heraufreguliert			
<i>ABCG5</i>	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 5</i>	2,65	0,006
<i>ABCG8</i>	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 8</i>	3,85	0,007
<i>ACAT2</i>	<i>Acetyl-CoA-Acetyltransferase 2</i>	2,68	0,007
<i>LDLR</i>	<i>low density lipoprotein receptor</i>	3,18	0,005
<i>MTTP</i>	<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>	1,75	0,006
<i>NPC1L1</i>	<i>Niemann-Pick C1-like protein 1</i>	2,48	0,006
<i>SCARB1</i>	<i>scavenger receptor class B 1</i>	2,36	0,006
herunterreguliert			
<i>DGAT2</i>	<i>diacylglycerol-O-acyltransferase 2</i>	-2,58	0,012
Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gensymbol	Genname	fold change^a	p-Wert^b
heraufreguliert			
<i>ACAT2</i>	<i>acetyl-CoA-acetyltransferase 2</i>	4,51	0,033
herunterreguliert			
<i>APOC2</i>	<i>apolipoprotein C2</i>	-1,94	0,043

^afold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane der verglichenen Gewebe

^bp-Wert: berechnet mit Wilcoxon-Rang-Test, korrigiert mittels Benjamini-Hochberg Prozedur

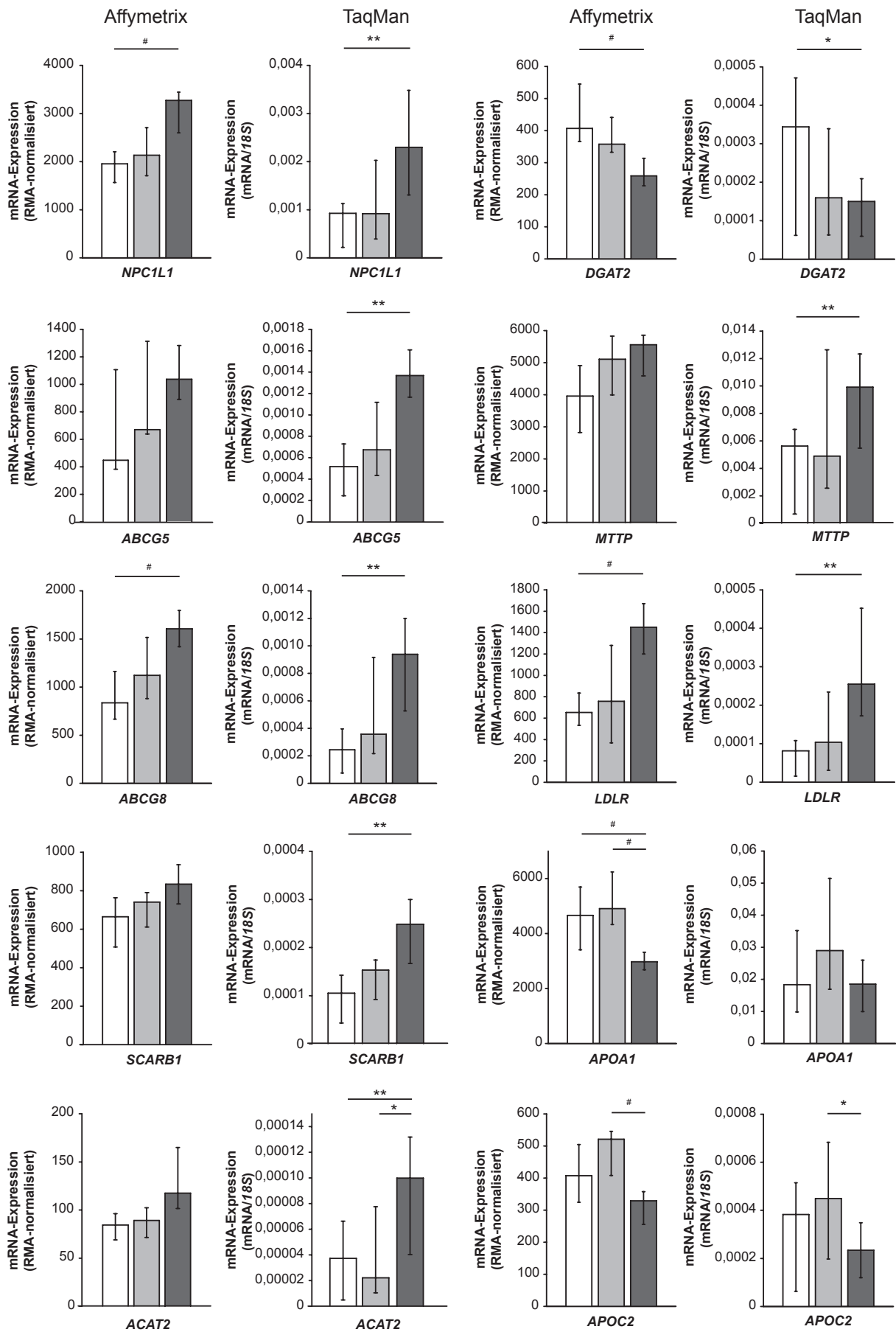


Abbildung 22 Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene von Fettverdauung und –absorption. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse. Differenziell exprimierte Gene (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) sind mit # gekennzeichnet. Jeweils rechts sind die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; *p < 0,05; **p < 0,01. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.3 Gene der Cholesterolsynthese

Gene, die am Cholesterolmetabolismus beteiligt sind, zeigten sowohl im Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum als auch im Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum eine starke Überrepräsentation (siehe 3.1.7 und 3.1.8). Aus diesem Grund wurde die Expression von sechs Genen der Cholesterolsynthese mittels qRT-PCR verifiziert. Fünf dieser Gene zeigten im Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB gegenüber dem oberen Dünndarm vor der Operation signifikant erhöhte Expressionswerte (siehe Abbildung 24 und Tabelle 5). Einzig für *DHCR7* wurde nur im Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum eine erhöhte Expression detektiert. In Abbildung 23 ist eine Modifikation der KEGG *Pathway* Karte „*steroid biosynthesis*“ (map00100)¹⁶⁵ dargestellt, die nur diejenigen Gene enthält, die verifiziert wurden.

Bei diesen sechs Genen handelte es sich um die *HMG-CoA-Reduktase (HMGCR)*, welche für das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterolsynthese kodiert, um *CYP51A1*, dessen Genprodukt die Demethylierung von Lanosterol katalysiert und um die *24-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR24)*, deren Protein für die Hydrierung von Sterolen an der 24-Doppelbindung verantwortlich ist¹⁶⁰. Desweiteren wurde die mRNA-Expression der *Lathosterol-Oxidase (SC5DL)* und der *7-Dehydrocholesterol-Reduktase (DHCR7)*, dessen Protein die Hydrierung der 7-Doppelbindung und somit den letzten Schritt in der Cholesterolsynthese katalysiert, sowie von *CYP7A1*, welches die Umsetzung von Cholesterol zu 7 α -Hydroxycholesterol katalysiert, verifiziert.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass im Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB im Vergleich zum oberen Dünndarm vor RYGB-Operation eine erhöhte Cholesterolsynthese stattfinden könnte.

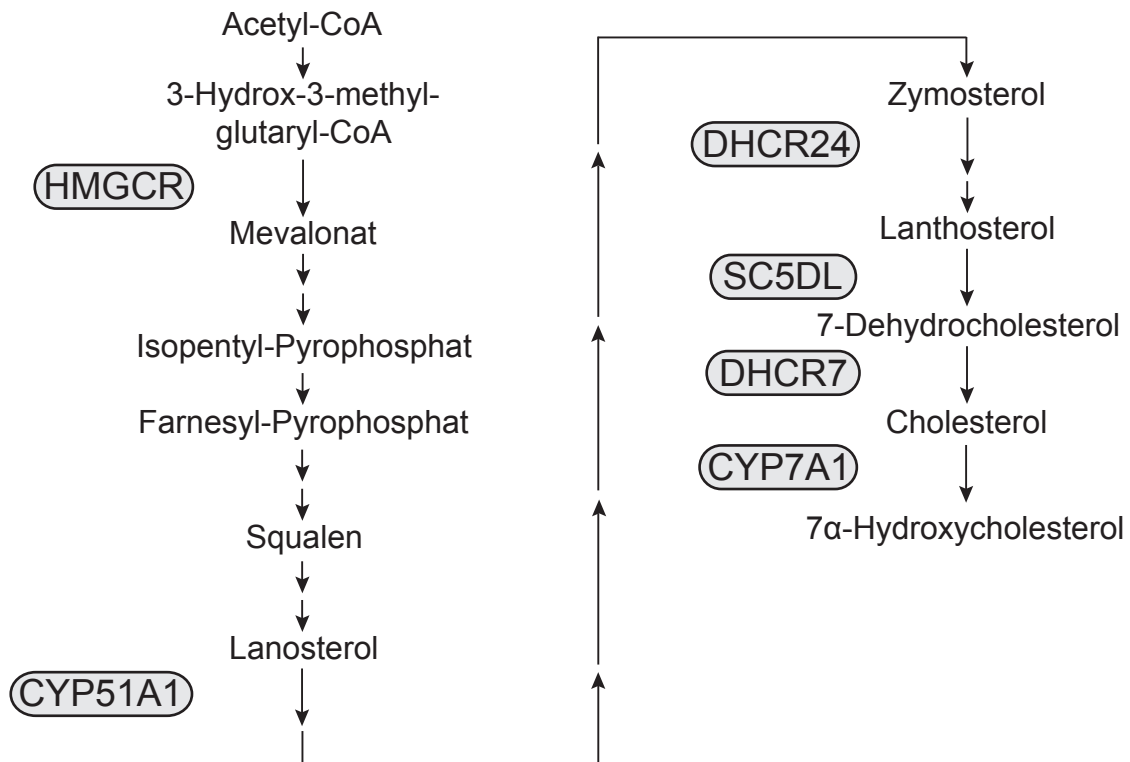


Abbildung 23 Modifizierte KEGG Pathway Karte „steroid biosynthesis“ (map00100).

Tabelle 5 Gene der Cholesterolsynthese - qRT-PCR

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	4,34	0,013
CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	4,23	0,005
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	3,03	0,006
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	2,64	0,005
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3,26	0,005
SC5DL	sterol-C5-desaturase	3,00	0,005

Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	6,86	0,030
CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	3,88	0,016
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	2,89	0,023
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3,53	0,023
SC5DL	sterol-C5-desaturase	2,78	0,043

^afold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane der verglichenen Gewebe

^bp-Wert: berechnet mit Wilcoxon-Rang-Test, korrigiert mittels Benjamini-Hochberg Prozedur

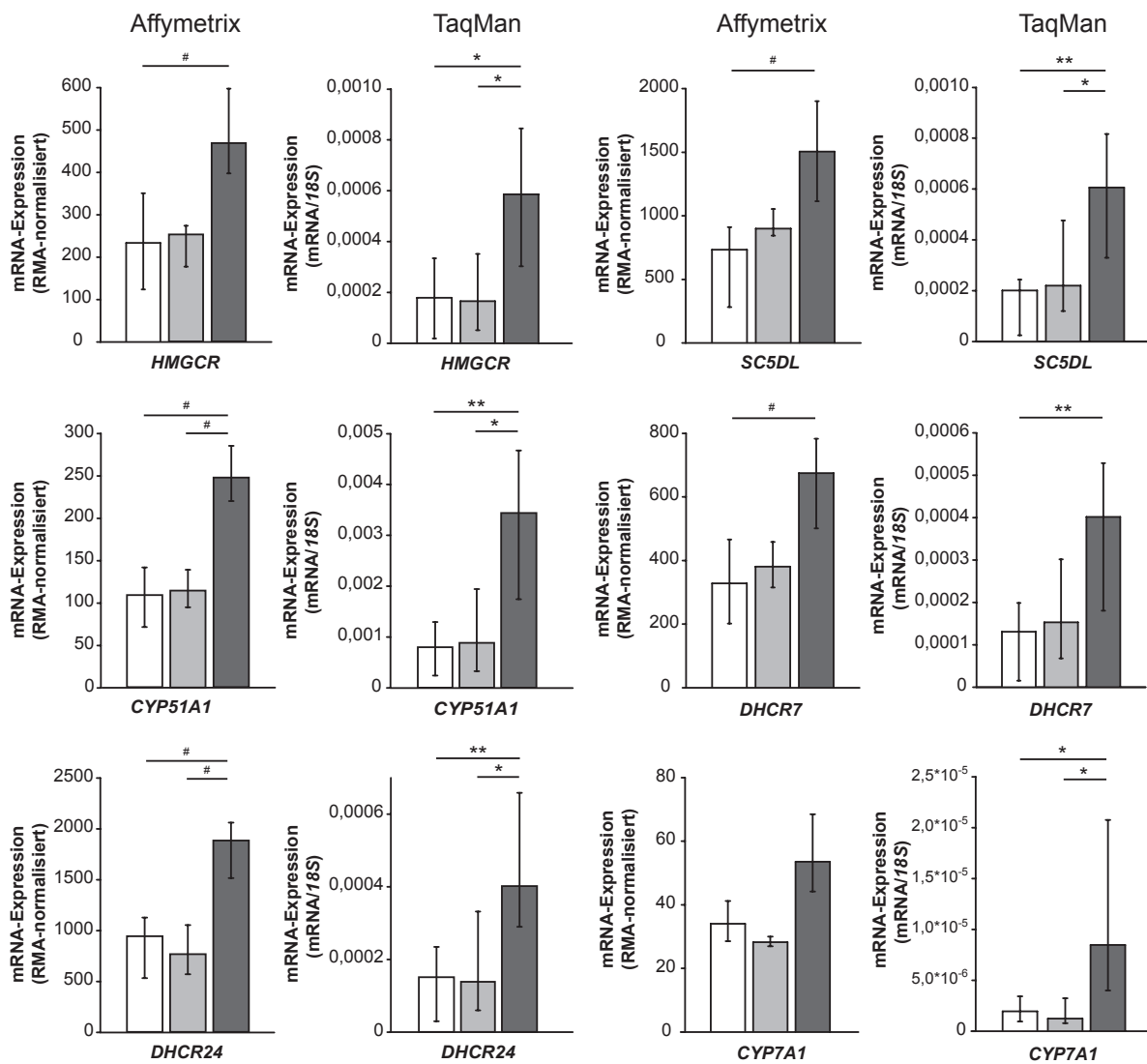


Abbildung 24 Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene der Cholesterolsynthese. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse. Differenziell exprimierte Gene (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) sind mit # gekennzeichnet. Jeweils rechts sind die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; p < 0,05; **p < 0,01. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.4 Gene, welche die Cholesterolumhomöostase regulieren

Da die Microarray-Analyse im Roux-Schenkel sowohl gegenüber Duodenum als auch Jejunum eine differenzielle Expression von Regulatoren der Cholesterolumhomöostase zeigte, wurden die entsprechenden Gene in die qRT-PCR-Analyse einbezogen (siehe Abbildung 25 und 26). So zeigte das Gen, welches für den Transkriptionsfaktor SREBF2 (sterol regulatory element binding transcription factor 2) kodiert, der über die Bindung an das cleavage-activation protein als positiver Regulator der Cholesterolumhomöostase wirkt^{171,172}, nur im Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum eine erhöhte Expression (siehe Tabelle 6). Dahingegen wies *STARD4*, welches durch SREBF2 reguliert wird und zu einer erhöhten Cholesterolsynthese führt¹⁷², im Roux-Schenkel sowohl gegenüber dem Duodenum als auch gegenüber dem Jejunum höhere Expressionswerte auf. Ebenso lagen die im Roux-Schenkel detektierten mRNA-Expressionswerte von *INSIG1*, welches über ein negatives *feedback* die Cholesterolsynthese kontrolliert¹⁷³, deutlich höher als in Duodenum oder Jejunum.

Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis dafür sein, dass aufgrund der Kombination aus erhöhter Cholesterolumabsorption und verstärkter Cholesterolumbiosynthese eine Anpassung der Regulationsmechanismen des Cholesterolummetabolismus notwendig ist.

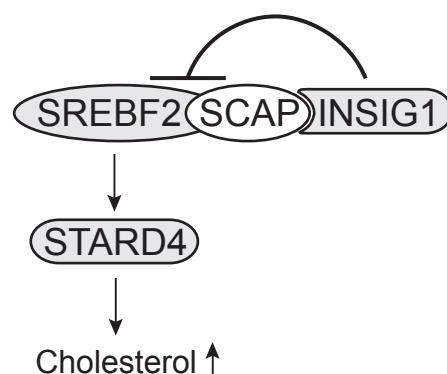


Abbildung 25 Schematische Darstellung der Regulation der Cholesterolumhomöostase durch SREBF2, STARD4 und INSIG1. Während SREBF2 und STARD4 die Cholesterolumsynthese positiv regulieren, zeigt INSIG1 inhibierende Effekte^{172,173}.

Tabelle 6 Gene, die an der Regulation der Cholesterolemie beteiligt sind – qRT-PCR

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>INSIG1</i>	<i>insulin induced gene 1</i>	13,32	0,005
<i>STARD4</i>	<i>StAR-related lipid transfer domain containing 4</i>	2,41	0,006
<i>SREBF2</i>	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 2</i>	2,67	0,006

Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>INSIG1</i>	<i>insulin induced gene 1</i>	12,00	0,015
<i>STARD4</i>	<i>StAR-related lipid transfer domain containing 4</i>	2,19	0,040

^afold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane der verglichenen Gewebe

^bp-Wert: berechnet mit Wilcoxon-Rang-Test, korrigiert mittels Benjamini-Hochberg Prozedur

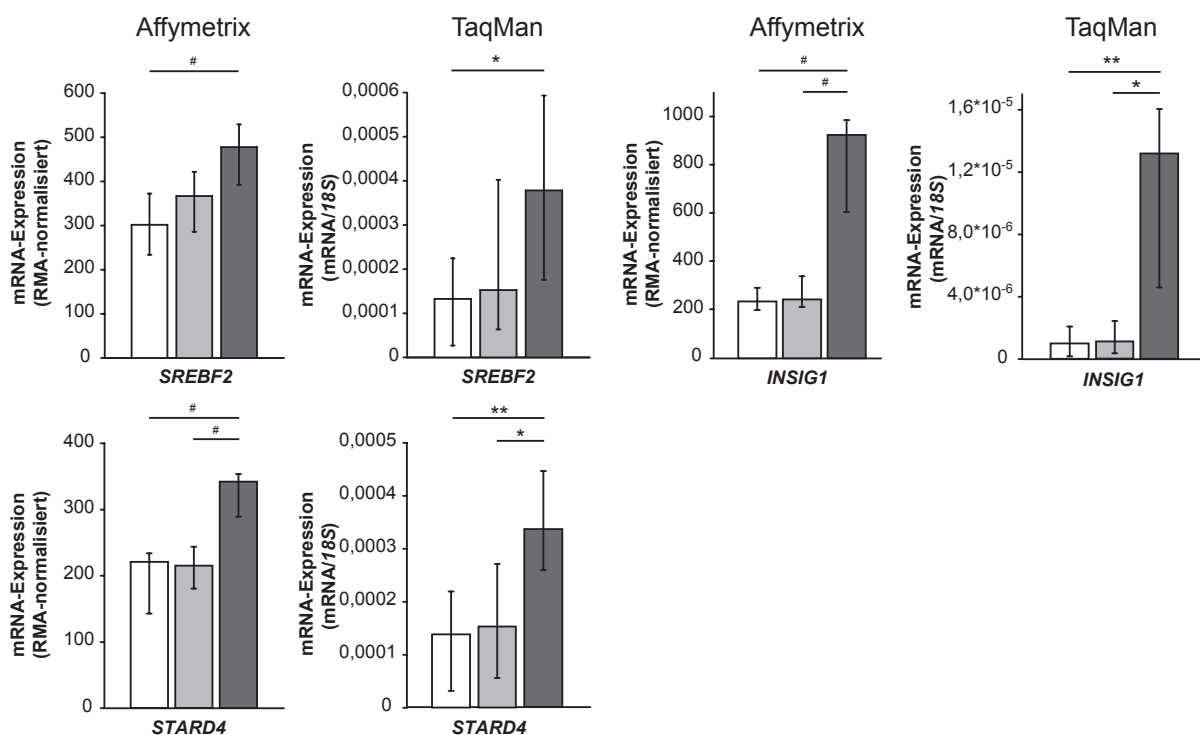


Abbildung 26 Microarray und qRT-PCR-Analysen von Genen, welche die Cholesterolemie kontrollieren. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse. Differenziell exprimierte Gene (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) sind mit # gekennzeichnet. Jeweils rechts sind die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; *p < 0,05; **p < 0,01. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.5 Gene des Kohlenhydratmetabolismus

Das Microarray-Experiment zeigte neben dem Cholesterollowerstand auch für einzelne Gene, die am Kohlenhydratmetabolismus beteiligt sind, eine differenzielle Regulation. Diese wurden ebenfalls mittels qRT-PCR verifiziert, da in der Literatur Veränderungen des Kohlenhydratmetabolismus als mögliche Ursachen für die positiven metabolischen Effekte einer RYGB-Operation genannt werden⁶³.

In Abbildung 27 sind die Funktionen und in Abbildung 28 und Tabelle 7 die Expressionswerte der entsprechenden Gene dargestellt. *PPARA*, dessen Genprodukt an der Regulation des Lipidmetabolismus und der Ketogenese beteiligt ist¹⁷⁴, wies im Roux-Schenkel eine leicht höhere Expression als im Duodenum auf, während *HMGCS2*, das für das Schlüsselenzym der Ketogenese kodiert, im Roux-Schenkel sowohl gegenüber dem Duodenum als auch gegenüber dem Jejunum eine signifikant niedrigere Expression zeigte. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis für eine verminderte Ketogenese im Roux-Schenkel sein.

PDK4 ist ein Gen, das für die Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 kodiert. Es kontrolliert den Pyruvat-dehydrogenase-Komplex, der die Glykolyse mit dem Zitratzyklus verbindet. Die *PDK4*-mRNA wies im Roux-Schenkel im Vergleich zum Jejunum signifikant niedrigere Expressionswerte auf. Einzig *PCK1*, welches für das Schlüsselenzym der Gluconeogenese kodiert, wurde im Roux-Schenkel höher exprimiert als im Duodenum und könnte somit ein Hinweis auf eine erhöhte Gluconeogenese im Roux-Schenkel geben. Für das Gen, das für den nukleären Rezeptor *NR0B2* kodiert, konnten in der qRT-PCR-Analyse die erwarteten Expressionsunterschiede nicht bestätigt werden.

Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse drauf hin, dass die RYGB-Operation zu Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel des oberen Dünndarms führt.

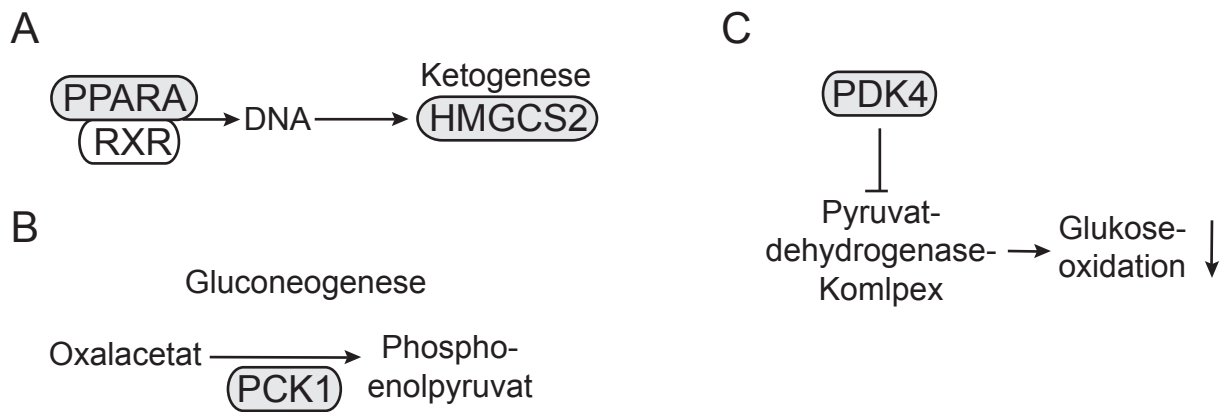


Abbildung 27 Gene mit Beteiligung am Kohlenhydratstoffwechsel. A) Regulation von HMGCS2 durch PPARA B) Beteiligung von PCK1 an der Glukoneogenese C) Hemmung der Glukoseoxidation durch PDK4

Tabelle 7 Gene des Kohlenhydratmetabolismus – qRT-PCR

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>PCK1</i>	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>	2,22	0,012
<i>PPARA</i>	<i>peroxisom proliferator activated receptor alpha</i>	1,65	0,027
herunterreguliert			
<i>HMGCS2</i>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i>	-10,11	0,012
Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
herunterreguliert			
<i>HMGCS2</i>	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2</i>	-6,74	0,021
<i>PDK4</i>	<i>pyruvatedehydrogenase kinase 4</i>	-4,54	0,021

^afold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane der verglichenen Gewebe

^bp-Wert: berechnet mit Wilcoxon-Rang-Test, korrigiert mittels Benjamini-Hochberg Prozedur

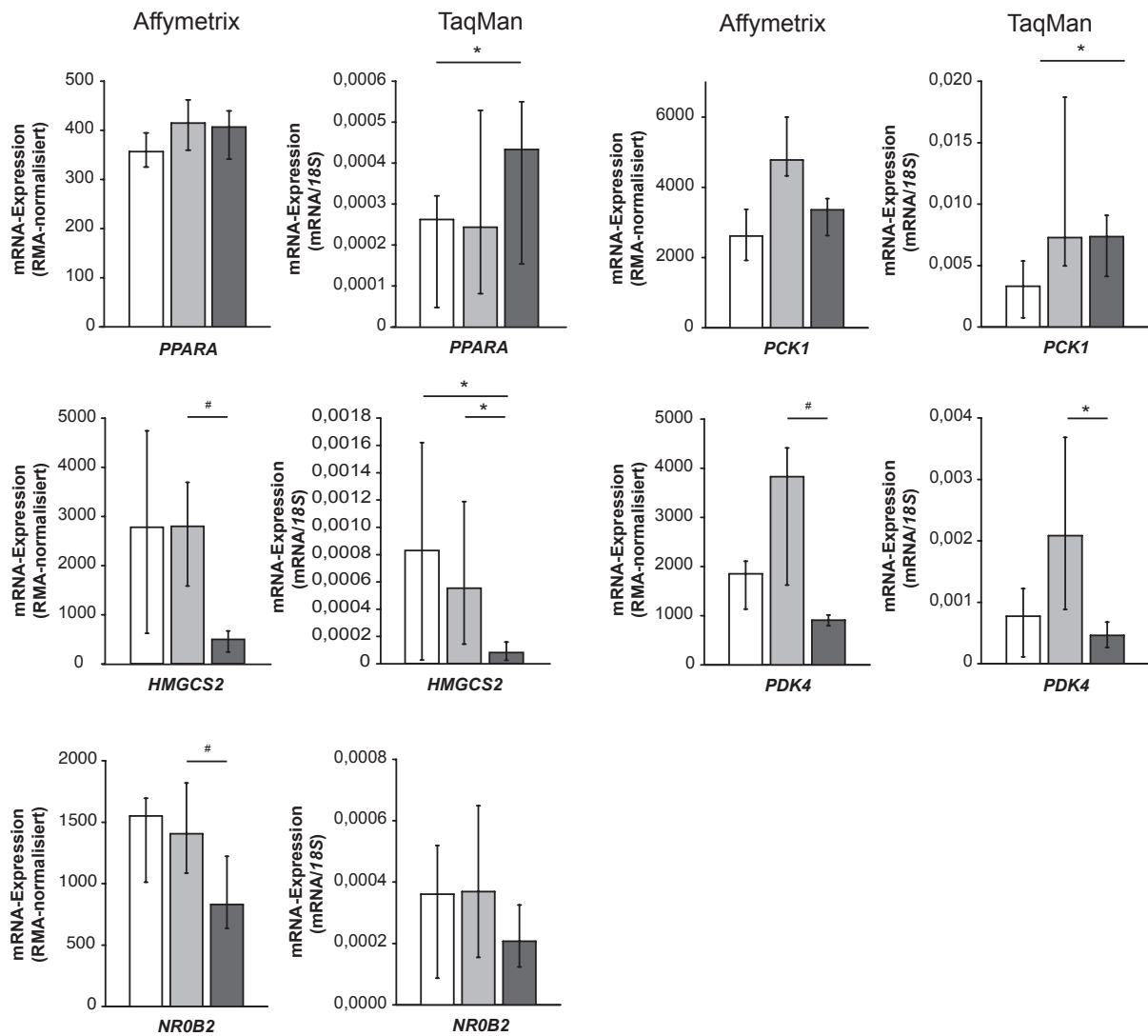


Abbildung 28 Microarray und qRT-PCR-Analysen von Genen des Kohlenhydratmetabolismus. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse. Differenziell exprimierte Gene (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) sind mit # gekennzeichnet. Jeweils rechts sind die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; * $p < 0,05$. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.6 Gene, die für Darmhormone kodieren

Darmhormone, insbesondere PYY und GLP-1, werden neben Gallensäuren am häufigsten als mögliche Mediatoren diskutiert, die an den positiven metabolischen Effekten einer RYGB-Operation beteiligt sein könnten²¹. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die mRNA-Expression von *PYY* und *Proglukagon*, welches unter anderem für das GLP-1 kodiert, mittels qRT-PCR verifiziert. Allerdings zeigten sowohl *PYY* als auch *Proglukagon* in der Microarray-Analyse weder im Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum noch Roux-Schenkel vs. Jejunum eine differenzielle Regulation. In der qRT-PCR-Analyse wurde dieses Ergebnis bestätigt (siehe Abbildung 29) und weist somit darauf hin, dass der Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB keine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *PYY* und *Proglukagon* zeigt.

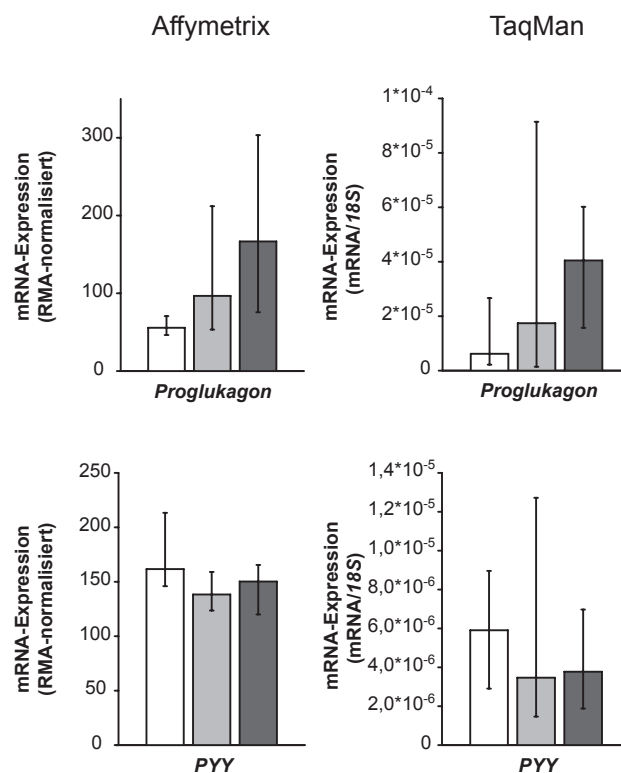


Abbildung 29 Microarray und qRT-PCR-Analysen der Gene, die für PYY und Proglukagon kodieren. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse, während jeweils rechts die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dargestellt sind. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Rang-Test berechnet. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.7 Der Effluxtransporter ABCB1

Der Roux-Schenkel zeigte ein Jahr nach RYGB sowohl gegenüber Duodenum als gegenüber Jejunum vor der Operation eine Überrepräsentation an differenziell exprimierten Genen, die unterschiedlichen Transportprozessen zugeordnet werden können (siehe 3.1.7 und 3.1.8). Im Microarray-Experiment wies der Effluxtransporter (siehe Abbildung 30) ABCB1, der als ein wichtiger Arzneistofftransporter bekannt ist¹⁷⁵, zwischen Roux-Schenkel und Duodenum eine differenzielle Expression auf (siehe Abbildung 31). Da die Einflüsse einer RYGB-Operation auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen, auch unter Beteiligung von Transportproteinen, kontrovers diskutiert werden⁷⁵⁻⁷⁷, wurde ABCB1 für die Verifizierung mittels qRT-PCR ausgewählt. In der qRT-PCR konnte das Ergebnis des Microarrays bestätigt werden. Hier zeigte der Roux-Schenkel eine 2,7-fach ($p = 0,014$) höhere Expression als im Duodenum.

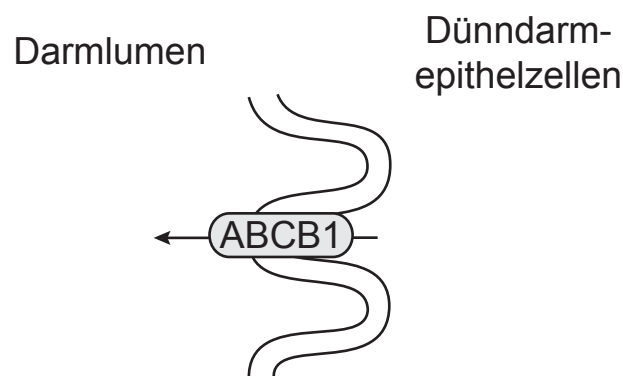


Abbildung 30 Funktion von ABCB1 im Darm.

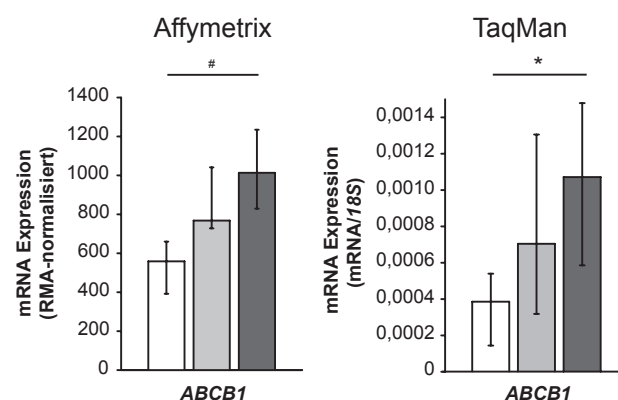


Abbildung 31 Microarray und qRT-PCR-Analysen von ABCB1.

Das linke Balkendiagramm zeigt das mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierte Ergebnis der Microarray-Analyse, in dem die differenzielle Expression (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) mit # gekennzeichnet ist, während das

recht das auf 18S normalisierten Ergebniss der qRT-PCR-Analyse zeigt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; *p < 0,05. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.8 Gene mit Beteiligung an der intestinalen Vitamin- und Mikronährstoffabsorption

Das Microarray-Experiment zeigte desweiteren eine differenzielle Expression von Genen, die am Transport und der Absorption von Vitaminen- und Mikronährstoffen aus dem Darmlumen beteiligt sind. In Abbildung 32 ist die modifizierte KEGG *Pathway* Karte „*vitamin digestion and absorption*“ (map04977) dargestellt mit denjenigen Genen, deren Expression in der vorliegenden Arbeit verifiziert wurde. Sowohl das Gen, das für den der Ascorbinsäure-Transporter SLC23A1 kodiert, als auch dasjenige für den Zink-Transporter SLC30A4 zeigten im Roux-Schenkel im Vergleich zum Duodenum erhöhte Expressionswerte. *Cubillin*, welches für den Rezeptor des Intrinsic Faktor-Vitamin B12-Komplex kodiert, zeigte im Roux-Schenkel sowohl gegenüber dem Duodenum als auch gegenüber dem Jejunum eine deutlich erhöhte Expression. Einzig *SLC10A2*, welches für den Natrium/Gallensäure-Co-Transporter kodiert, wies in beiden Vergleichen für den Roux-Schenkel deutlich niedrigere Expressionswerte auf. Für den Folsäuretransporter *SLC46A1* ließen sich die erwarteten Expressionsunterschiede nicht in der qRT-PCR bestätigen (siehe Tabelle 8 und Abbildung 33).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass im Roux-Schenkel im Vergleich zum oberen Dünndarm vor der Operation eine erhöhte Absorption von Vitaminen und Mikronährstoffen sowie eine verminderte Resorption von Gallensäuren stattfinden könnten.

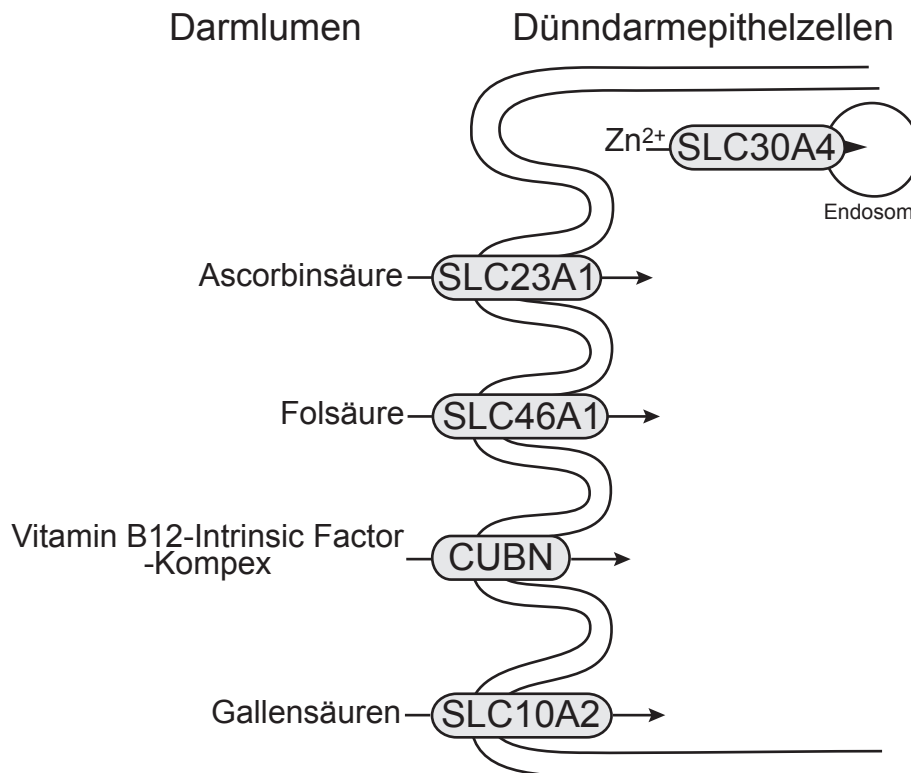


Abbildung 32 Modifizierte KEGG Pathway Karte „vitamin digestion and absorption“ (map04977).

Tabelle 8 Gene mit Beteiligung an der intestinalen Vitamin- und Mikronährstoffabsorption –qRT-PCR

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>CUBN</i>	<i>cubilin</i>	15,51	0,008
<i>SLC23A1</i>	<i>solute carrier family 23, member 1</i>	2,44	0,006
<i>SLC30A4</i>	<i>solute carrier family 30, member 4</i>	2,0	0,006
herunterreguliert			
<i>SLC10A2</i>	<i>solute carrier family 10, member 2</i>	-6,58	0,007

Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>CUBN</i>	<i>cubilin</i>	8,11	0,015
<i>SLC10A2</i>	<i>solute carrier family 10, member 2</i>	-2,40	0,029

^afold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane der verglichenen Gewebe

^bp-Wert: berechnet mit Wilcoxon-Rang-Test, korrigiert mittels Benjamini-Hochberg Prozedur

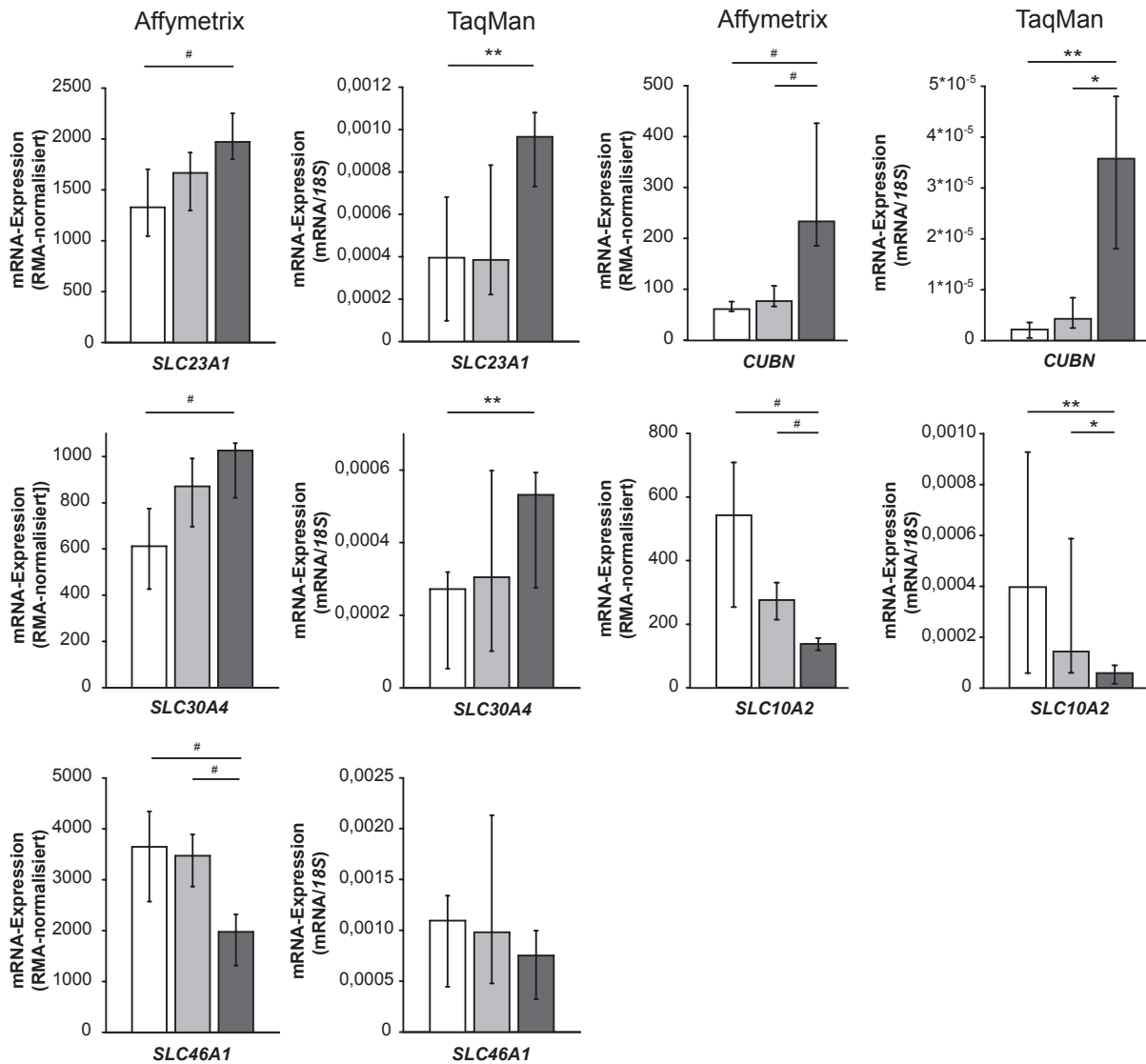


Abbildung 33 Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene der Vitamin- und Mikronährstoffabsorption. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse. Differenziell exprimierte Gene (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) sind mit # gekennzeichnet. Jeweils rechts sind die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR Analyse dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; *p < 0,05; **p < 0,01. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilsabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.2.9 Gene des Retinolmetabolismus

Im Zusammenhang mit Genen der Vitaminabsorption und des Vitaminmetabolismus fielen in der Microarrayanalyse insbesondere drei Gene auf, welche am Retinolmetabolismus im Dünndarmepithel beteiligt sind (siehe Abbildung 34). Sowohl die *β-Carotene-15,15'-Monooxygenase 1 (BCMO1)*, welche für das Schlüsselenzym in der Biotransformation von β -Caroten zu Vitamin A kodiert¹⁷⁶, als auch *RDH11*

(*retinol dehydrogenase 11*), dessen Genprodukt zur Umsetzung von all-trans Retinal zu all-trans-Retinol führt und *LRAT* (*lecithin retinol acyltransferase*), dessen Genprodukt die Veresterung von Retinol katalysiert, zeigten im Roux-Schenkel im Vergleich zu Duodenum und Jejunum eine erhöhte mRNA-Expression sowohl im Microarray-Experiment als auch in der qRT-PCR-Analyse (siehe Abbildung 35 und Tabelle 9). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass im Roux-Schenkel eine erhöhte Vitamin A Synthese im Vergleich zum oberen Dünndarm vor der RYGB-Operation stattfindet.

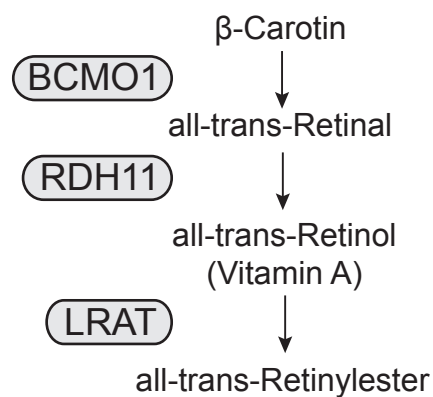


Abbildung 34 Modifizierte KEGG Pathway Karte „retinol metabolism“ (map00830).

Tabelle 9 Gene des Retinolmetabolismus – qRT-PCR

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>BCMO1</i>	<i>beta-carotene oxygenase 1</i>	10,64	0,005
<i>LRAT</i>	<i>lecithin retinol acyltransferase</i>	2,38	0,007
<i>RDH11</i>	<i>retinol dehydrogenase 11</i>	3,76	0,005
Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gensymbol	Genname	fold change ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			
<i>BCMO1</i>	<i>beta-carotene oxygenase 1</i>	4,79	0,015
<i>LRAT</i>	<i>lecithin retinol acyltransferase</i>	2,44	0,043
<i>RDH11</i>	<i>retinol dehydrogenase 11</i>	3,40	0,02

^afold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane der verglichenen Gewebe

^bp-Wert: berechnet mit Wilcoxon-Rang-Test, korrigiert mittels Benjamini-Hochberg Prozedur

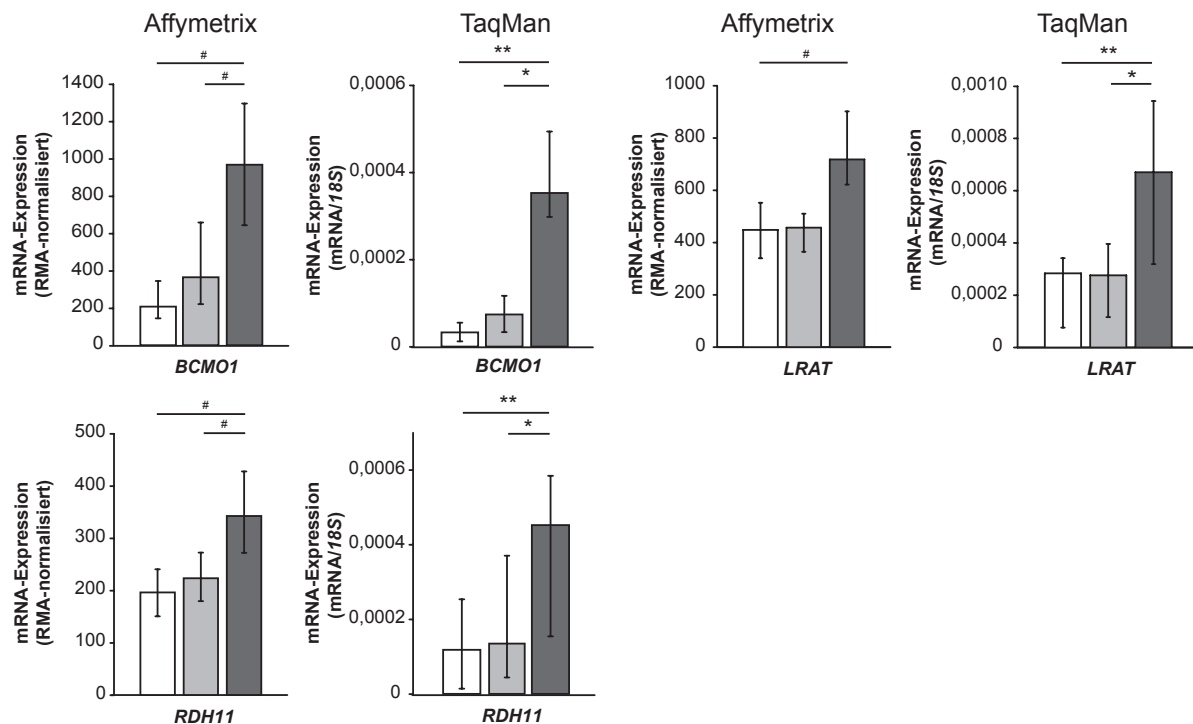


Abbildung 35 Microarray und qRT-PCR-Analysen ausgewählter Gene des Retinolmetabolismus. Für jedes Gen zeigt das linke Balkendiagramm jeweils die mittels RMA (*robust-multi-array average*) normalisierten Ergebnisse der Microarray-Analyse. Differenziell exprimierte Gene (*fold change* < -1,5 oder > 1,5; FDR < 5%; mindestens 50% distinkt exprimiert) sind mit # gekennzeichnet. Jeweils rechts sind die auf 18S normalisierten Ergebnisse der qRT-PCR-Analyse dargestellt. Die p-Werte wurden mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, und mit Benjamini-Hochberg korrigiert; *p < 0,05; **p < 0,01. Es ist jeweils der Median der normalisierten Expressionswerte dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die weißen Balken stehen für das Duodenum, die hellgrauen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel.

3.3 Validierung der Expression ausgewählter microRNAs

Auch bei der Messung der genomweiten microRNA-Expression mittels der TaqMan® Array MicroRNA Cards Pool A und B entsteht eine große Anzahl an Messwerten, so dass nach statistischer Auswertung auch hier falsch positive Ergebnisse auftreten können. Aus diesem Grund wurde die Expression ausgewählter microRNAs ebenfalls mittels individueller TaqMan® Assays verifiziert.

Da im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Interaktion von *BCMO1*, dem Schlüsselenzym der Vitamin A Synthese mit den microRNAs miR-130a, miR-301a und miR-454 näher untersucht werden sollte, wurde die Expression dieser drei microRNAs individuell verifiziert. Aufgrund der begrenzten Menge an Gesamt-RNA, stand für diese Validierung nur noch die RNA von sieben Patienten zur Verfügung, statt der RNA von elf Patienten, die für das *screening* der microRNA-Expression

verwendet wurden. In Abbildung 36 sind sowohl die Expressionsdaten der drei microRNAs aus dem *screening* als auch aus dem Validierungsexperiment für Roux-Schenkel und Jejunum ausgeführt. Im *screening* lagen die Expressionswerte für die drei microRNAs im Roux-Schenkel signifikant niedriger als im Jejunum - und zwar für miR-130a um das 2,1-fache ($p=0,004$), für miR-301a um das 1,2-fache ($p=0,016$) und für miR-454 um das 2,5-fache ($p=0,006$). Trotz der etwas schwächer ausfallenden Expressionsunterschiede, die eventuell auf die geringere Probenanzahl zurückzuführen sind, wurden die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Roux-Schenkel und Jejunum mittels Individualassays bestätigt. Für miR-130a wurde eine 1,8-fach ($p=0,016$), für miR-301a eine 1,1-fach ($p=0,047$) und für miR-454 eine 1,4-fach ($p=0,047$) niedrigere Expression im Roux-Schenkel als im Jejunum detektiert.

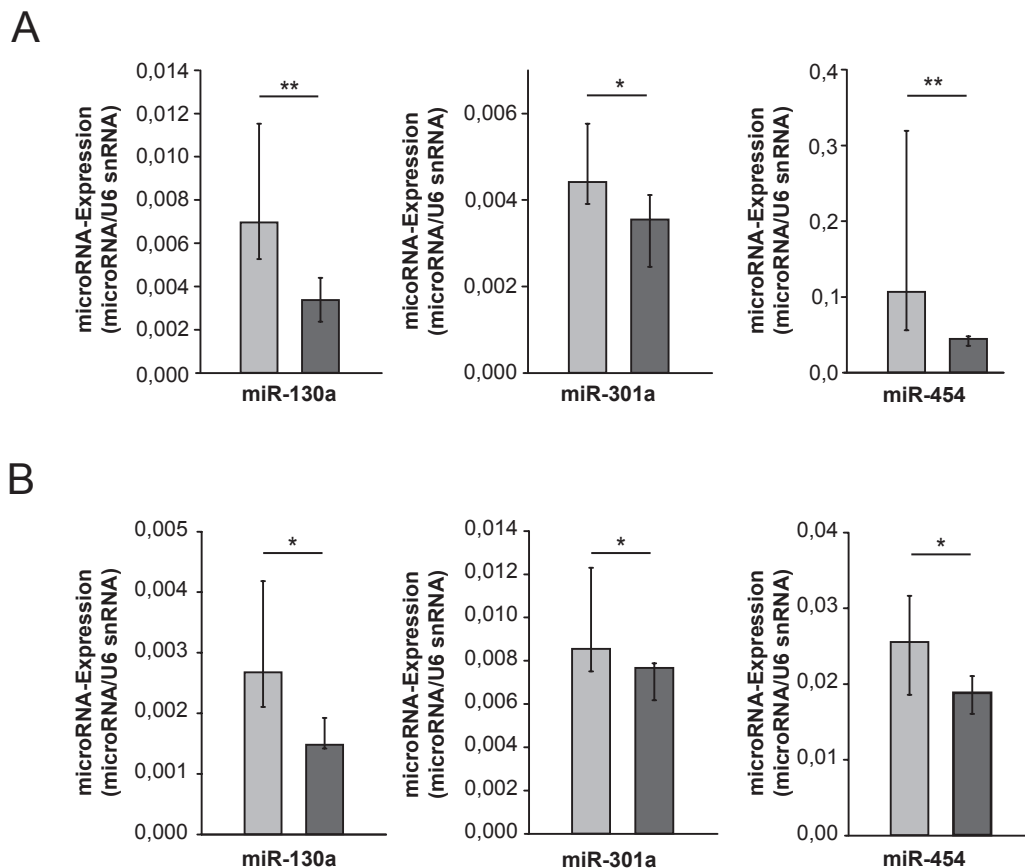


Abbildung 36 Expressionsunterschiede von miR-130a, miR-301 und miR-454 zwischen Roux-Schenkel und Jejunum. A) Darstellung der Expressionsunterschiede aus dem *screening* basierend auf den Proben von 11 Patienten. B) Darstellung der Expressionsunterschiede aus dem Validierungsexperiments basierenden auf den Proben von 7 Patienten. Es sind jeweils die auf U6 snRNA normalisierten Expressionswerte als Median abgebildet, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand. Die hellgrauen Balken stehen für das Jejunum und die dunkelgrauen für den Roux-Schenkel. Die statistische Signifikanz wurde mittels Wilcoxon-Rang-Test berechnet, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.4 Ursachen für die Adaptationsprozesse im jejunalen Gewebe nach RYGB

Nachdem die mRNA- und microRNA-Expressionsdaten von Roux-Schenkel und Jejunum darauf hinwiesen, dass im jejunalen Gewebe im ersten Jahr nach der RYGB-Operation Adaptationsprozesse auf molekularer Ebene ablaufen, sollten diese am Beispiel von *BCMO1* näher charakterisiert werden. Hierfür sollte auf der einen Seite untersucht werden, ob die Veränderungen der mRNA-Expression zwischen Roux-Schenkel und Jejunum durch einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus via microRNAs erklärt werden können. Auf der anderen Seite sollte in einem *in-vitro* etablierten Zellmodell analysiert werden, ob die Abwesenheit des Gallensäureeinflusses zu den beobachteten Veränderungen auf molekularer Ebene im Roux-Schenkel führen könnte.

3.4.1 Validierung der vorhergesagten Interaktion von miR-130a, miR-301a und miR-454 mit der *BCMO1*-3'-UTR

Für die drei microRNAs miR-130a, miR-301 und miR-454 wurde durch drei Datenbanken eine Bindung an die *BCMO1*-3'-UTR vorhergesagt. Zusätzlich wiesen alle drei potentiellen Paare signifikant negative Korrelationen auf, und die Expressionsunterschiede ließen sich auch mittels individueller TaqMan® Assays bestätigen. Um diese vorhergesagten Bindungen nun tatsächlich nachzuweisen, wurden Luciferase-Reportergen-Assays durchgeführt. Hierzu wurde die gesamte Sequenz der *BCMO1*-3'-UTR in den pmirGLO-Vektor direkt hinter die kodierende Sequenz der *Firefly*-Luciferase kloniert. Nach der Insertion der *BCMO1*-3'-UTR war weiterhin die Expression beider Luciferasen möglich. Die Bindung einer microRNA an die eingefügten 3'-UTR führt allerdings zu einer Destabilisierung der mRNA der *Firefly*-Luciferase und somit zu einem Translationsstopp, wodurch das detektierte Lichtsignal der *Firefly*-Luciferase reduziert wird. Die *Renilla*-Luciferase wird weiterhin unverändert exprimiert und dient als endogene Kontrolle (siehe 2.4.2.27). Um zu überprüfen, ob eine Verminderung des *Firefly*-Signals im Luciferase-Assay tatsächlich durch die spezifische Bindung einer microRNA an die vorhergesagte Bindestelle der 3'-UTR verursacht wird, wurde die *seed*-Region im Vektor mittels gezielter Mutagenese mutiert. Sollte das Signal der *Firefly*-Luciferase nach der gezielten Mutation der *seed*-Region wieder unvermindert detektiert werden und somit

ähnliche Werte wie der Leervektor aufweisen, deutet dies auf eine spezifische Bindung der microRNA an der *seed*-Sequenz hin, die nach der Mutation nicht mehr möglich ist.

3.4.2 Interaktion von miR-130a mit der *BCMO1*-3'-UTR

Zur experimentellen Untersuchung der Bindung von miR-130a an die *BCMO1*-3'-UTR wurden Luciferase-Assays durchgeführt (siehe Abbildung 37). Hierfür wurden die CaCo2 Zellen entweder mit dem Leervektor oder dem Vektorkonstrukt, das die Wildtyp *BCMO1*-3'-UTR enthielt sowie jeweils entweder mit 100 nM pre-miR-130a oder mit 100 nM pre-miR-Negativkontrolle, kotransfiziert. Im Anschluss wurde die nachfolgende Berechnung verwendet, um die relative Reportergen-Aktivität zu ermitteln: $[\text{Vektorkonstrukt} + \text{pre-miR} / \text{Vektorkonstrukt} + \text{pre-miR-NC}] / [\text{Leervektor} + \text{pre-miR} / \text{Leervektor} + \text{pre-miR-NC}]$. Wie Abbildung 37 zu entnehmen ist, war miR-130a nicht in der Lage, das Reportergen-Signal relativ zum Leervektor herab zu regulieren. Diese Beobachtung lässt den Schluß zu, dass miR-130a nicht an die *BCMO1*-3'-UTR bindet.

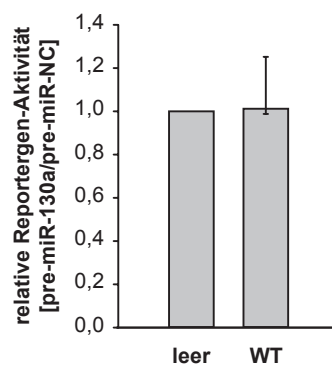


Abbildung 37 Interaktion von miR-130a mit der *BCMO1*-3'-UTR- Luciferase-Assay.

miR-130a ist nicht in der Lage das Reportergen-Signal des Wildtyp (WT) Vektors relativ zum Leervektor (leer) herab zu regulieren. Es wurde jeweils der Median dargestellt, der Fehlerbalken basiert auf dem Interquartilabstand, die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test (n=5) überprüft.

3.4.3 Interaktion von miR-301a mit der *BCMO1*-3'-UTR

Zur experimentellen Analyse der Bindung von miR-301a an die *BCMO1*-3'-UTR wurden ebenfalls Luciferase-Assays durchgeführt. Auch hier wurde das Wildtyp

Vektorkonstrukt entweder mit 100 nM pre-miR-301a oder 100 nM pre-miR-Negativkontrolle kotransfiziert. Das Reporter-gen-Signal wurde durch die miR-301a relativ zum Leervektor (leer) um 63% vermindert (siehe Abbildung 38). Um zu überprüfen, ob die beobachtete Reduktion der relativen Reporter-gen-Aktivität auf die spezifische Bindung von miR-301a an Position 77-100 der *BCMO1*-3'-UTR Sequenz zurückzuführen ist, wurden fünf Basen (Position 94-98) in der *seed*-Region der vorhergesagten Bindestelle mittels gezielter Mutagenese ausgetauscht. Nach Transfektion des Vektorkonstrukts mit dieser mutierten *seed*-Region (MU1) wurde das Reporter-gen-Signal noch immer um 53% im Vergleich zum Leervektor vermindert. Durch diese Beobachtung ergab sich die Frage, ob sich in der *BCMO1*-3'-UTR weitere Bindestellen für die miR-301a befinden, die zusammen mit der erstgenannten für die beobachtete Reduktion des Reporter-gen-Signals verantwortlich sein könnten. Mittels der RNAhybrid Software wurde eine weitere putative Bindestelle für miR-301a in der *BCMO1*-3'-UTR an Position 113-136 vorhergesagt. In dieser vorhergesagten Bindesequenz wurden vier Basen der *seed*-Region (Position 132-135) mittels gezielter Mutagenese mutiert (MU2). Nach Transfektion des Vektorkonstruktes MU2 zeigte sich im Luciferase-Assay nur noch eine Reduktion des relativen Reporter-gen-Signals um 17% relativ zum Leervektor. In einem weiteren Vektorkonstrukt wurden nun beide Bindestellen mutiert (MU1 + MU2). Nach Transfektion mit diesem Vektorkonstrukt (MU1 + MU2) unterschied sich das Reporter-gen-Signal nicht mehr signifikant von dem des Leervektors. Aus diesen Beobachtungen folgt, dass miR-301a spezifisch über zwei Bindestellen an Position 77-100 und 113-136 mit der *BCMO1*-3'-UTR interagieren kann. Die Interaktion von miR-301a über die beiden identifizierten Bindestellen in der *BCMO1*-3'-UTR ist in Abbildung 39 dargestellt.

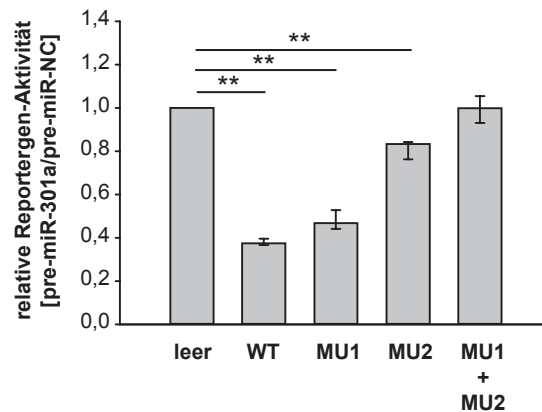


Abbildung 38 Interaktion von miR-301a mit der *BCMO1*-3'-UTR - Luciferase-Assays.

miR-301a reguliert das Reporter-Signal des Wildtyp (WT) Vektors relativ zum Leervektor (leer) um 63% herab. Nach Mutation der ersten *seed*-Region (MU1) wurde das Reporter-Signal durch miR-301a noch um 53% relativ zum Leervektor herunterreguliert. Die Mutation der zweiten *seed*-Region (MU2) führt zu einer Herunterregulation um 17% relativ zum Leervektor, wohingegen die gleichzeitige Mutation von beiden Bindestellen (MU1 + MU2) keinen signifikanten Unterschied zum Leervektor aufweist. Es wurde jeweils der Median dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand, die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test (n=5) berechnet, **p < 0,01

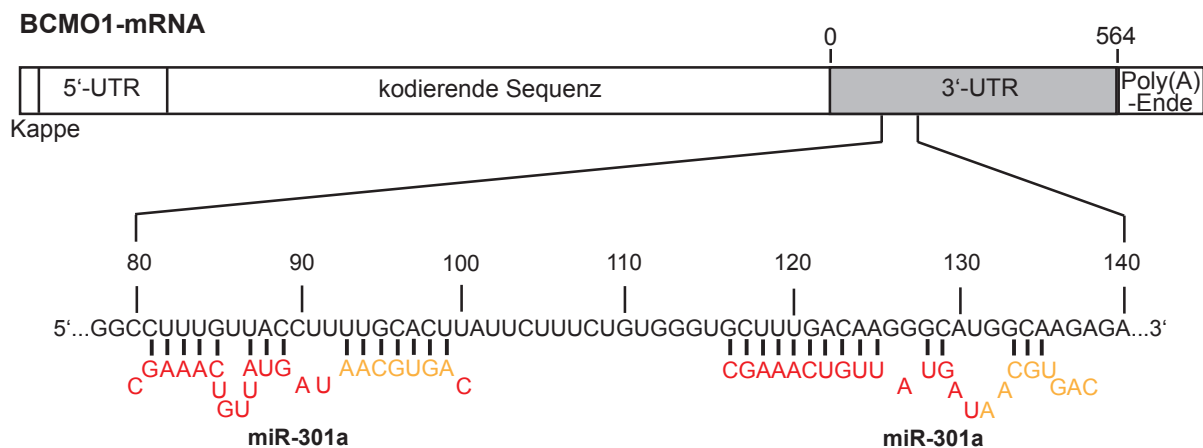


Abbildung 39 Schematische Darstellung der identifizierten Bindestellen von miR-301a in der *BCMO1*-3'-UTR. Im unteren Teil der Abbildung ist eine Vergrößerung des Bereiches der *BCMO1*-3'-UTR dargestellt, in dem die identifizierten Bindestellen für miR-301a liegen. Die microRNA-Sequenz ist in rot dargestellt und die *seed*-Region ist orange eingefärbt.

3.4.4 Interaktion von miR-454 mit der *BCMO1*-3'-UTR

Als drittes wurde die vorhergesagte Bindung von miR-454 an die *BCMO1*-3'-UTR mittels Luciferase-Assays analysiert. Nach Kotransfektion des Wildtyp Vektorkonstrukts entweder mit 100 nM pre-miR-454 oder 100 nM pre-miR-Negativkontrolle, zeigte sich eine signifikante Herabregulation des Reporter-Signals relativ zum Leervektor (leer) um 11% (siehe Abbildung 40). Auch hier wurde

zusätzlich mit dem Vektorkonstrukt MU1 transfiziert, um zu überprüfen, ob die beobachtete Reduktion des Reporter-gen-Signals auf die spezifische Bindung von miR-454 an die vorhergesagte Bindestelle an Position 77-100 verursacht wurde. Nach Transfektion des Vektorkonstrukts MU1 zeigte das Reporter-gen-Signal genau wie beim Wildtyp Vektorkonstrukt eine Reduktion um 11% relativ zum Leervektor. Dies deutete darauf hin, dass der beobachtete Effekt nicht im Zusammenhang mit der vorhergesagten Bindestelle an Position 77-100 stand. Nach Kotransfektion des Vektorkonstrukts MU2, das die Mutation in der putativen *seed*-Region an Position 132-135 enthielt, zeigte sich zwischen dem Reporter-gen-Signal von MU2 und dem vom Leervektor kein signifikanter Unterschied. Diese Beobachtung gab einen Hinweis darauf, dass im Falle der miR-454 die zweite vorhergesagte Bindestelle an Position 113-136 für den im Luciferase-Assay beobachteten Effekt verantwortlich war. Trotz dieser Beobachtung wurde auch für die miR-454 noch eine Kotransfektion mit dem Vektorkonstrukt MU1 + MU2 durchgeführt, das in beide Bindestellen mutiert war. Nach dieser Transfektion unterschied sich das Reporter-gen-Signal ebenfalls nicht signifikant von dem des Leervektors. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass miR-454 spezifisch über die Bindestelle an Basenpaar-Position 113-136 mit der *BCMO1*-3'-UTR interagiert.

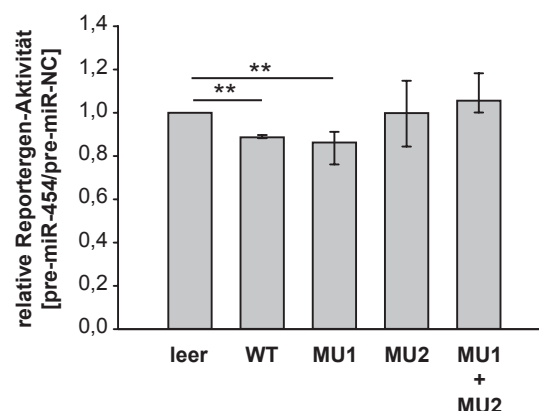


Abbildung 40 Luciferase-Assays zur Untersuchung der Bindung von miR-454 an die *BCMO1*-3'-UTR. miR-454 reguliert das Reporter-gen-Signal des Wildtyp (WT) Vektors relativ zum Leervektor (leer) um 11% herab. Während die Mutation der ersten *seed*-Region (MU1) keinen Effekt zeigt, führte die Mutation der zweiten *seed*-Region (MU2) dazu, dass sich das Signal nicht von dem des Leervektors unterschied. Die gleiche Beobachtung wurde nach gleichzeitiger Mutation von beiden Bindestellen (MU1 + MU2) gemacht. Es wurde jeweils der Median dargestellt, die Fehlerbalken basieren auf dem Interquartilabstand, die statistische Signifikanz wurde mittels Mann-Whitney-U Test (n=5) berechnet, **p < 0,01

3.4.5 Einfluss von miR-301a und miR-454 auf den BCMO1-Proteingehalt

Da microRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren entweder zu einer Degradation der mRNA oder zu einer Translationshemmung führen, sollte ihre Bindung an die Zielgen-mRNA auch zu einer Verminderung des Proteingehaltes des Zielgens führen. Um den potentiellen Einfluss der Bindung von miR-301a und miR-454 an die *BCMO1*-3'-UTR im Bezug auf den BCMO1-Proteingehalt zu untersuchen, wurden CaCo2 Zellen mit dsRed als Transfektionskontrolle und entweder mit 100 nM pre-miR-301a, 100 nM pre-miR-454 oder 100 nM pre-miR-Negativkontrolle kotransfiziert. Der Proteingehalt von BCMO1 wurde anschließend mittels Western-Blot relativ zu β -Aktin und dsRed quantifiziert. Der repräsentative Western-Blot zeigt eine um 15% signifikant verminderte BCMO1-Proteinmenge in den Zellen, die mit miR-301a transfiziert wurden (siehe Abbildung 41) im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Transfektion mit miR-454 zeigte hingegen keine signifikante Herabregulation der BCMO1-Proteinmenge relativ zur Negativkontrolle.

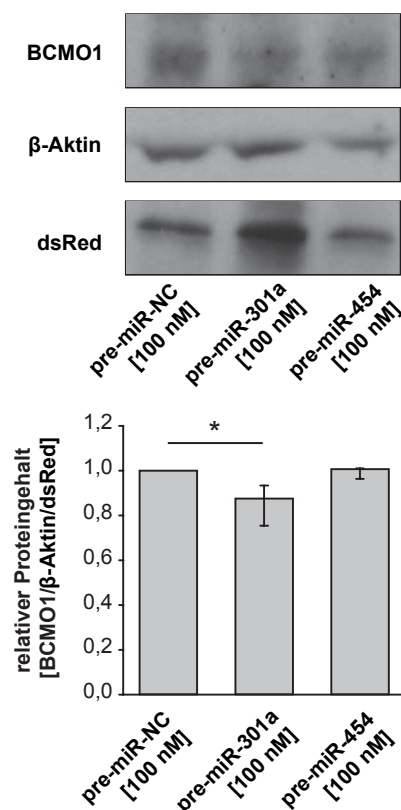


Abbildung 41 Western-Blot zur Überprüfung des Einflusses von miR-301a und miR-454 auf den BCMO1-Proteingehalt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die densitometrische Auswertung der Western-Blots mittels Image J. Der Proteingehalt wurde relativ zu β -Aktin und dsRed berechnet (Mann-Whitney-U Test, n=3). P-Wert: *p < 0,05

Unter Einbeziehung der Ergebnisse des Luciferase-Assays lässt sich schließen, dass die miR-301a spezifisch über die Bindestellen an Position 77-100 und 113-136 mit der *BCMO1*-3'-UTR interagiert und über diese Bindung in der Lage ist den *BCMO1*-Proteingehalt signifikant zu reduzieren.

3.5 Einfluss von Gallensäuren auf *BCMO1*

In der aktuellen Literatur werden Gallensäuren als wichtige Mediatoren diskutiert, die zu den positiven metabolischen Effekten einer RYGB-Operation beitragen könnten⁷⁸. Unter physiologischen Bedingungen treten Gallensäuren sowie Pankreasenzyme im Duodenum in den Verdauungstrakt ein und passieren das gesamte Jejunum bevor ein Großteil im Ileum rückresorbiert wird. Nach einer RYGB-Operation befindet sich der Roux-Schenkel an der früheren anatomischen Position des Duodenums und kommt mit Gallensäuren und Verdauungsenzymen nicht mehr in Berührung. Daraus ergab sich die Frage, ob die Abwesenheit des Gallensäureeinflusses im Roux-Schenkel zu den in den Patientenproben beobachteten Expressionsänderungen führen könnte. Diese Frage sollte am Beispiel von *BCMO1* und miR-301a in einem zellbasierten Modell untersucht werden.

Hierzu wurden CaCo2 Zellen zunächst für 21 Tage kultiviert. In diesem Zeitraum entwickelte sich durch Differenzierung eine dem Dünndarmepithel ähnliche Morphologie¹⁵⁶. Anschließend wurden die Zellen für 24 h entweder mit 100 µM Cholsäure (CA), mit 100 µM Lithocholsäure (LCA), mit 100 µM Deoxycholsäure (DCA), mit 100 µM Chenodeoxycholsäure (CDCA) oder 0,25% DMSO (C) als Kontrolle behandelt. Die mit Gallensäuren behandelten Zellen dienten als Modell für das Jejunum, welches unter physiologischen Bedingungen mit Gallensäuren in Kontakt kommt, während die mit Vehikel (DMSO) behandelten Zellen das Modell für den Roux-Schenkel darstellten, der keinen Gallensäurekontakt mehr hat. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde sowohl die Expression von *BCMO1* als auch diejenige von miR-301a mittels qRT-PCR vermessen.

Abbildung 42 zeigt die Expression von miR-301a relativ zur endogenen Kontrolle U6 snRNA nach Behandlung von CaCo2 Zellen mit verschiedenen Gallensäuren. Nach Behandlung mit Cholsäure zeigten die CaCo2 Zellen eine 1,1-fach höhere miR-301a Expression im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel), nach Behandlung mit Lithocholsäure eine 2,4-fach höhere Expression, nach Behandlung mit Deoxycholsäure eine 1,3-fach höhere Expression und nach Behandlung mit Chenodeoxycholsäure eine 1,5-fach höhere Expression. Tendenziell erhöhte sich demzufolge die Expression von miR-301a nach Behandlung mit Gallensäuren, wobei nur durch Lithocholsäure und Chenodeoxycholsäure eine signifikante Steigerung hervorgerufen wurde ($p < 0,05$).

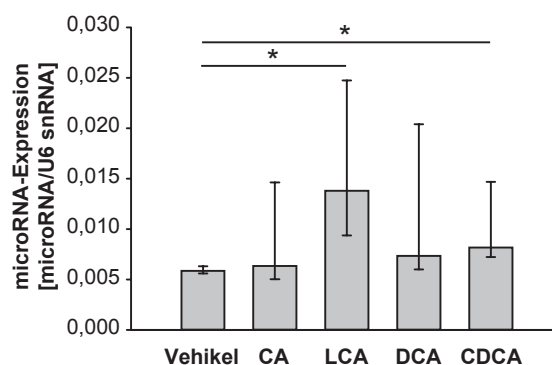


Abbildung 42 Einfluss von Gallensäuren auf die Expression von miR-301a in CaCo2 Zellen.

Die Behandlung mit LCA und CDCA führte zu einer signifikanten Steigerung der miR-301a Expression gegenüber der Kontrolle (Vehikel) (Mann-Whitney-U Test, $n=6$). P-Wert: * $p < 0,05$. CA = Cholsäure; LCA = Lithocholsäure; DCA = Deoxycholsäure; CDCA = Chenodeoxycholsäure; Vehikel = DMSO.

In Abbildung 43 ist die mRNA-Expression von *BCMO1* relativ zu *18S* in differenzierten CaCo2 Zellen nach Gallensäurebehandlung dargestellt. Die Behandlung mit Gallensäuren führte im Bezug auf die *BCMO1* mRNA-Expression zu keinen signifikanten Veränderungen, was wahrscheinlich auf die hohen Schwankungen in den Expressionsdaten zurückgeführt werden kann. Der Median der *BCMO1*-Expression derjenigen Zellen, die mit Cholsäure behandelt wurden, lag allerdings tendenziell unter demjenigen der Kontrolle. Dahingegen zeigte der Median derjenigen Zellen, die mit Lithocholsäure behandelt wurden, keinen Unterschied zur Kontrolle, während derjenige der mit Deoxycholsäure und Chenodeoxycholsäure behandelnden Zellen tendenziell auf eine höhere *BCMO1* mRNA-Expression im Vergleich zu Kontrolle hindeutete.

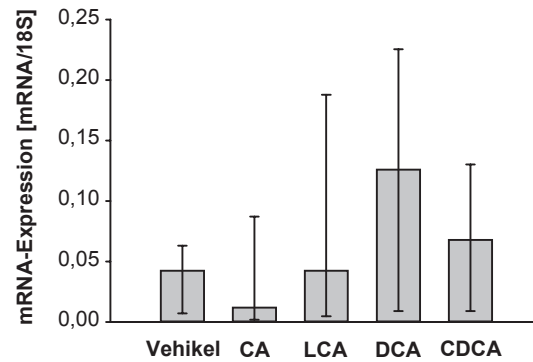


Abbildung 43 Einfluss von Gallensäuren auf die mRNA-Expression von *BCMO1* in CaCo2 Zellen. Keine der Gallensäuren führte zu einer signifikanten Veränderung der *BCMO1* mRNA-Expression gegenüber der Kontrolle (Vehikel) (Mann-Whitney-U Test, n=8). CA = Cholsäure; LCA = Lithocholsäure; DCA = Deoxycholsäure; CDCA = Chenodeoxycholsäure; Vehikel = DMSO

Neben dem Einfluss von Gallensäuren auf die mRNA-Expression wurde deren Einfluss auf den BCMO1-Proteingehalt untersucht. Hierfür wurde die BCMO1-Proteinmenge relativ zu β -Aktin mittels Western-Blot Analyse quantifiziert (siehe Abbildung 44). Im Western-Blot zeigte sich eine signifikant um 16% verminderte BCMO1-Proteinmenge ($p=0,014$) nach Behandlung mit Cholsäure im Vergleich zur Kontrolle, während die anderen Gallensäuren keinen signifikanten Einfluss zeigen. Zusammengenommen gaben diese Ergebnisse aus dem Gallensäureversuch einen ersten Hinweis darauf, dass der Wegfall des Gallensäurekontaktes mit an den Veränderungsprozessen im Roux-Schenkel beteiligt sein könnte.

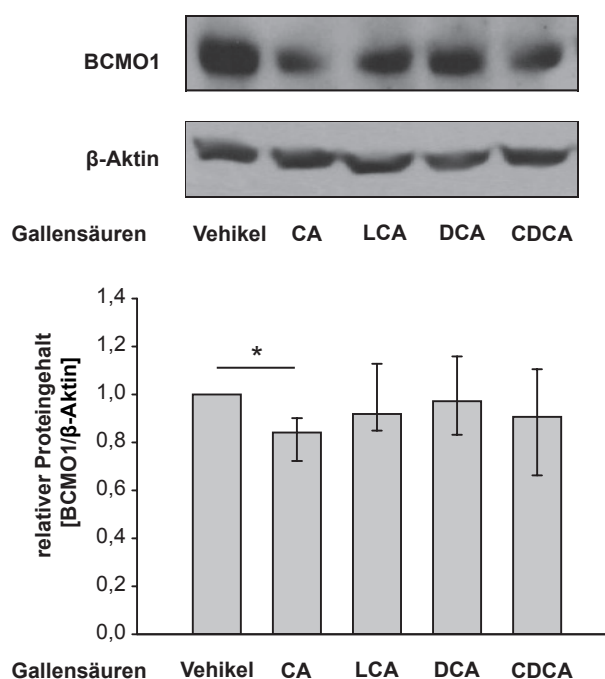


Abbildung 44 Cholsäure vermindert den relativen BCMO1-Proteingehalt in CaCo2 Zellen. Differenzierte CaCo2 Zellen wurden für 24 h entweder mit 100 µM Cholsäure (CA), Lithocholsäure (LCA), Deoxycholsäure (DCA), Chenodeoxycholsäure (CDCA) oder 0,25% DMSO (Vehikel) als Kontrolle behandelt. Die Western-Blot Analyse zeigt eine um 16% signifikant vermindertes BCMO1-Proteinmenge ($p=0,014$) nach Behandlung mit Cholsäure. Die Proteinmenge wurden relativ zu β -Aktin berechnet und auf die DMSO-Kontrolle bezogen. (Mann-Whitney-U Test, $n=4$). P-Wert: $*p < 0,05$

3.5.1 Vorhersage potentieller Transkriptionsfaktorbindestellen in der Promotorregion von *BCMO1* und miR-301a

Um zu ermitteln, ob die Ergebnisse des Gallensäureversuchs möglicherweise mit der Bindung bestimmter Transkriptionsfaktoren im Zusammenhang stehen könnten, wurde eine computergestützte Vorhersage von Transkriptionsfaktorbindestellen in den Promotorregionen von *BCMO1* und miR-301a durchgeführt. Im Detail sollte untersucht werden, ob die Promotorregionen von *BCMO1* und miR-301a putative Bindestellen für Transkriptionsfaktoren aufweisen, für die in der Literatur bereits eine Regulation durch Gallensäuren beschrieben wurde. Während für die untersuchte Promotorregion von *BCMO1* keine entsprechenden Bindestellen vorhergesagt wurden, weist die Promotorregion von miR-301a mehrere putative Bindestellen für verschiedene solcher Transkriptionsfaktoren auf. Bei diesen Transkriptionsfaktoren handelte es sich um den Leber-X-Rezeptor (LXR), den Pregnan-X-Rezeptor (PXR)¹⁷⁷, den konstitutiven Andostan-Rezeptor (CAR)¹⁷⁸ und den Vitamin-D-Rezeptor (VDR)¹⁷⁹. Diese Transkriptionsfaktoren werden zu der Unterfamilie der Thyroidhormonrezeptor-ähnlichen Rezeptoren gezählt, und binden an ähnliche Motive. Die putativen Bindestellen in der Promotorregion von miR-30a wurden auf Chromosom 17 an Basenpaar-Position 59154752-59154773 für VDR, CAR, PXR, an Position 59155534-59155549 für VDR, und an den Positionen 59160496-59160513 und 5915904-59159064 für LXR, PXR und CAR vorhergesagt.

4 Diskussion

Die proximale Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation ist die weltweit am häufigsten angewendete Methode in der bariatrischen Chirurgie, weil sie sowohl zu einer sehr effektiven und langfristigen Gewichtsreduktion als auch zu einer deutlichen Verbesserung des gesamten Gesundheitsstatus der Patienten führt^{11,20}. So zeigten auch die Patienten der vorliegenden Studie eine bedeutende Verbesserung ihrer metabolischen Situation. Ein Jahr nach der RYGB-Operation erhielten von acht Patienten nur noch zwei eine antidiabetische und fünf eine antihypertensive Pharmakotherapie. Die Prozesse, die diesen metabolischen Verbesserungen zu Grunde liegen, sind bisher allerdings erst unzureichend verstanden. Als mögliche Ursachen werden der Einfluss der erhöhten GLP-1 und PYY-Spiegel^{24,26,27}, sowie der veränderte Gallenfluss³⁹⁻⁴², die Änderung des Mikrobioms^{49,50}, des Energieumsatzes⁶², der neuroendokrinen Signalübertragung^{68,69} und der Nahrungsmittelauswahl⁶⁴⁻⁶⁶ diskutiert. Außerdem steht auch eine Beteiligung von intestinalen Adaptationsprozessen⁷⁸ zur Diskussion. Bisher fehlen aber umfassende Daten, welche die Auswirkungen einer RYGB auf den humanen Dünndarm beleuchten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, durch die Analyse der genomweite mRNA- und microRNA-Expressionsmuster ein besseres Verständnis für die Auswirkungen einer RYGB-Operation auf die molekulare Ebene des oberen menschlichen Dünndarms zu erlangen. Hierdurch sollten Einblicke in die Adaptationsprozesse gewonnen werden, die im ersten Jahr nach RYGB insbesondere im Roux Schenkel ablaufen.

4.1 Jejunum vs. Duodenum - Die physiologische Ausgangssituation im oberen Dünndarm

Der erste Teil der Untersuchung konzentrierte sich auf den Vergleich von Jejunum und Duodenum vor der RYGB-Operation. Im Mittelpunkt dieser Analyse stand die Frage, inwieweit sich die physiologischen Expressionsprofile von Jejunum und Duodenum bei stark adipösen Patienten unterscheiden. Hierdurch sollte ein

Überblick über die molekularbiologische Ausgangssituation im oberen Dünndarm vor der RYGB-Operation erhalten werden.

In der vorliegenden Arbeit waren zwischen Jejunum und Duodenum, trotz unterschiedlicher physiologischer Funktionen, nur 29 Gene differenziell exprimiert, die vorwiegend für Proteine kodierten, welche an der Reaktion auf reaktive Sauerstoffspezies und an der Proteinmodifikation beteiligt sind. Dies könnte darauf hindeuten, dass der obere Dünndarm der Patienten einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt war, auf den Duodenum und Jejunum unterschiedlich stark reagierten. Diese Überlegung wird von Studien gestützt, die zeigen, dass starkes Übergewicht mit einer systemischen Entzündung im Körper¹⁸⁰, die auch den Darm beeinflussen kann^{47,181,182} sowie mit erhöhtem oxidativem Stress¹⁸³ einhergeht. Desweiteren ist bekannt, dass fettreiche Nahrung zu oxidativem Stress im oberen Dünndarm führt, auf den das Jejunum stärker reagiert als das Duodenum^{184,185}. Da die hier eingeschlossenen adipösen Patienten mit hoher Wahrscheinlichkeit vor der RYGB-Operation fettreiche Nahrung zu sich nahmen, könnte dies eine Erklärung dafür sein, dass das Jejunum im Vergleich zum Duodenum eine erhöhte Expression der entsprechenden mRNAs zeigte.

In der vorliegenden Arbeit standen keine Gewebeproben aus dem oberen Dünndarm von gesunden normalgewichtigen Probanden zur Verfügung, um deren Expressionsprofile direkt mit denen von Duodenum und Jejunum der RYGB-Patienten vergleichen zu können. Um einen Anhaltspunkt für die Einordnung der Expressionsprofile der RYGB-Patienten zu erhalten, wurde die Studie von Comelli *et al.*¹⁸⁶ herangezogen. Comelli *et al.*¹⁸⁶ zeigten, dass Duodenum und Jejunum auch bei gesunden Probanden relativ ähnliche Expressionsmuster aufwiesen. Diejenigen Gene, die eine differenzielle Expression zeigten, waren allerdings nicht mit oxidativem Stress, sondern mit metabolischen Prozessen wie Steroltransport, Polysaccharidverdauung und Metabolismus zellulärer Amide assoziiert. Diese Beobachtung deutet an, dass eine starke Adipositas die intestinale Genexpression zu beeinflussen scheint. Gestützt wird diese Annahme durch Beobachtungen aus dem Tiermodell, in welchem ebenfalls eine Veränderung der intestinalen Genexpressionsmuster durch Adipositas beobachtet wurde¹⁸⁷. Auf Grundlage dieser Daten kann vermutet werden, dass die physiologische Situation im Dünndarm der stark adipösen RYGB-Patienten auf mRNA-Ebene nicht mit derjenigen von

gesunden normalgewichtigen Probanden gleichgesetzt werden kann. Welche Faktoren für die veränderte Expression unter Adipositas ursächlich sind, ist jedoch noch unklar.

Im Vergleich zeigten die microRNA-Expressionsprofile von Jejunum und Duodenum der RYGB-Patienten deutlichere Unterschiede mit 129 differenziell exprimierten microRNAs. Die Korrelationsanalyse und die *in-silico* Zielgenvorhersage ließen aber auf keine Interaktionen der microRNAs mit den 29 differenziell exprimierten mRNAs schließen. Die 129 differenziell exprimierten microRNAs könnten allerdings darauf hinweisen, dass Jejunum und Duodenum individuell durch ihre gewebespezifischen microRNA-Expressionsprofile charakterisiert werden. Diese Hypothese wird durch zahlreiche Studien gestützt, die in unterschiedlichsten Geweben spezifische microRNA-Expressionsmuster identifiziert haben, welche eine wichtige Rolle für die Identität, Differenzierung und Funktion der einzelnen Gewebe spielen ¹⁸⁸⁻¹⁹¹.

Die verfügbaren Daten zu microRNA-Expressionsprofilen des humanen Dünndarms sind sehr begrenzt. So wurden bisher nur sehr kleine Probenzahlen ¹⁹² oder weiter distal gelegene Abschnitte des Darms ¹⁹³ untersucht. Aus diesem Grund konnten die microRNA-Expressionsprofile der stark adipösen Patienten dieser Arbeit nicht denen von gesunden Probanden gegenübergestellt werden. Da für andere Organe wie Leber, Pankreas oder Fettgewebe aber bereits veränderte microRNA-Expressionmuster unter Adipositas beschrieben wurden ¹⁹⁴, ist anzunehmen, dass die Adipositas auch die microRNA-Expressionsprofile im Dünndarm beeinflusst. Somit ist es wahrscheinlich, dass sich die intestinale microRNA-Expression der adipösen Patienten dieser Arbeit, ähnlich der mRNA-Expression, von derjenigen gesunder normalgewichtiger Probanden unterscheidet.

4.2 Roux-Schenkel vs. Duodenum – Anpassung an die anatomischen Veränderungen

Im zweiten Teil der Untersuchungen wurde der Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum näher analysiert. In diesem Vergleich sollte die Frage untersucht werden, ob die Veränderung der anatomischen Position des Roux-Schenkels im Gastrointestinaltrakt und damit auch die veränderten Umwelteinflüsse, die auf das Gewebe einwirken, intestinale Adaptationsprozesse induzieren. Zusätzlich stellte

sich die Frage, ob diese Adaptationsprozesse zu einer Annäherung der Expressionsprofile des Roux-Schenkels an jene des Duodenums führen, da der Roux-Schenkel nach der RYGB-Operation die frühere anatomische Position des Duodenums einnimmt.

Auf Ebene der mRNA-Expression wurden in dem Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum zwei verschiedene Beobachtungen gemacht. Auf der einen Seite adaptierten sich bestimmte Gene des Roux-Schenkels in ihren Expressionsprofilen an das Duodenum. Während sich Jejunum und Duodenum vor der RYGB-Operation in der Expression von 29 Genen mit Assoziation zu oxidativem Stress unterschieden, zeigten ein Jahr nach der Operation nur noch drei dieser Gene einen Expressionsunterschied zwischen dem jejunalen Gewebe des Roux-Schenkels und dem Duodenum. Diese Beobachtung weist auf Adaptationsprozesse im Roux-Schenkel hin, die auf eine Reduktion von stressassoziierten Prozessen hindeuten. Dies passt zu den Ergebnissen aus Studien, welche eine Verminderung von systemischer Entzündung und oxidativem Stress als Folge einer Gewichtsreduktion beschrieben¹⁹⁵⁻¹⁹⁷.

Zusätzlich wurden zwischen Roux-Schenkel und Duodenum weitere 83 Gene identifiziert, die eine differenzielle Expression zeigten. Da diese Gene vor der RYGB-Operation zwischen Jejunum und Duodenum keine Expressionsunterschiede aufwiesen, folgt aus dieser Beobachtung, dass sich ihre Expression im Roux-Schenkel innerhalb des ersten Jahres nach der Operation verändert hat. Diese Veränderungen bezogen sich vor allem auf Fettverdau, Steroidmetabolismus, Alkohol- und Vitaminmetabolismus sowie Transportprozesse, insbesondere den Steroltransport.

Im Bezug auf den Fettstoffwechsel schien der Roux-Schenkel insbesondere durch einen verstärkten Cholesterollowerstand gekennzeichnet zu sein. So ließen die erhöhte Expression von *NPC1L1*, *SCARB1* und *LDLR*, deren Proteine für die Cholesterolaufnahme aus Nahrung bzw. aus Blut verantwortlich sind¹⁶⁹, auf eine verstärkte Cholesterolaufnahme im Roux-Schenkel schließen. Ebenso waren die Gene der Effluxtransporter *ABCG5* und *ABCG8*, welche die Cholesterolaufnahme limitieren^{166,169}, höher exprimiert als im Duodenum. Die erhöhten Expressionswerte von *ACAT2* und *MTTP*, deren Proteine an der Überführung von Cholesterol in

Cholesterolester¹⁶⁷ und deren Transport¹⁶⁸ beteiligt sind, wiesen auf eine verstärkte Speicherung von Cholesterol im Roux-Schenkel im Vergleich zum Duodenum hin. Einzig *DGAT2*, welches an der Bildung von Triglyceriden beteiligt ist¹⁷⁰, zeigte im Roux-Schenkel eine niedrigere Expression als im Duodenum. Interessanterweise beschreiben Choi *et al.*¹⁹⁸, dass eine verminderte hepatische *DGAT2*-Expression in adipösen Mäusen zur Reduktion einer Insulinresistenz sowie zu verminderten Triglycerid-Spiegeln und somit zu einer Verbesserung der metabolischen Situation führt. Inwieweit diese Beobachtung aus der Mäuseleber auf den menschlichen Darm übertragen werden und so zur Erklärung der metabolischen Verbesserungen der RYGB-Patienten beitragen könnte, ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch unklar.

Neben der verstärkten Cholesterolaufnahme deutete die erhöhte Expression von *HMGCR*, *CYP51A1*, *DHCR24*, *SC5DL*, *DHCR7* und *CYP7A1*¹⁶⁰ zudem auf eine gesteigerte Cholesterolsynthese im Roux Schenkel im Vergleich zum Duodenum hin. Da sowohl Cholesterolsorption als auch Biosynthese in den Enterozyten parallel ablaufen, müssen diese Prozesse durch eine feine Regulation im Gleichgewicht gehalten werden¹⁹⁹. Dies geschieht unter anderem durch *SREBF2* und *STARD4*, welche die Cholesterolaufnahme und Biosynthese induzieren^{172,200}, und durch *INSIG1*, das die Cholesterolsynthese über ein negatives *feedback* kontrolliert¹⁷³. Die erhöhte Expression dieser drei genannten Gene könnte somit auf eine ausgeprägtere Kontrolle des Cholesterolsstoffwechsels im Roux-Schenkel im Vergleich zum Duodenum hinweisen.

Die Ursache für den verstärkten Cholesterolsstoffwechsel im Roux-Schenkel könnte darin liegen, dass der Körper versucht, eine mögliche Malabsorption zu kompensieren, die nach der RYGB-Operation aufgrund der verkleinerten Absorptionsoberfläche im Dünndarm auftreten kann¹⁹. Gegen diese Annahme spricht jedoch die Studie von Pihlajamäki *et al.*²¹², die ein Jahr nach RYGB verminderte Spiegel von Serummarkern für Cholesterolsorption und Biosynthese im Blut von RYGB-Patienten im Vergleich zu Patienten vor der Operation identifizierte. Unter Einbeziehung der Studie von Saeidi *et al.*⁶³, welche die Auswirkungen einer RYGB-Operation auf den Dünndarm von Ratten untersuchten, eröffnet sich allerdings ein weiterer Interpretationsansatz. Saeidi *et al.*⁶³ beschrieben interessanterweise in Ratten nach RYGB-Operationen Veränderungen des intestinalen Cholesterolsstoffwechsels, die den Veränderungen, die in dieser Arbeit

bei RYGB-Patienten beobachtet wurden, stark ähnelten. So zeigte der Roux-Schenkel der operierten Ratten erhöhte mRNA- und Proteinmengen von Genen der Cholesterolaufnahme (*LDLR*), der Cholesterol-biosynthese (*HMGCR*, *CYP51A1*) sowie deren Regulation *SREBF2*, während sich die Lipidprofile von Serum und Leber der Ratten verbesserten. Desweiteren beobachteten Saeidi *et al.* morphologische Veränderungen des Rattendarms nach RYGB, die durch eine deutliche Zunahme der intestinalen Massen gekennzeichnet waren. Auf Grundlage dieser Daten postulierten Saeidi *et al.* ⁶³, dass die Ursache für den verstärkten Cholesterolmetabolismus und den verminderten trans-intestinalen Cholesterolflux in einem erhöhten intestinalen Cholesterolbedarf des Roux-Schenkels für Gewebewachstum und -versorgung liegt. Entsprechend beschrieben Spak *et al.* ⁹³ ebenfalls morphologische Veränderungen im menschlichen Dünndarm nach RYGB, die auf eine Erhöhung der intestinalen Masse nach RYGB hindeuteten. Basierend auf dieser Beobachtung von Spak *et al.* und dem in der vorliegenden Arbeit beobachteten erhöhten Cholesterolmetabolismus des Roux-Schenkels kann somit vermutet werden, dass der humane Dünndarm nach RYGB ebenfalls einen erhöhten Energiebedarf aufweisen könnte, der zumindest zum Teil über das Cholesterol gedeckt wird.

Zusätzlich zu dem erhöhten Cholesterolmetabolismus identifizierten Saeidi *et al.* ⁶³ eine deutliche Umprogrammierung des intestinalen Glukosestoffwechsels der Ratten, welcher mindestens im gleichen Maße zur Deckung des langfristig erhöhten Energiebedarfs des Rattendarms nach RYGB beitragen soll. Weiter nehmen Saeidi *et al.* ⁶³ an, dass die metabolischen Veränderungen im Roux-Schenkel der Ratten eine direkte Rolle für die metabolischen Verbesserungen nach RYGB spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden in den Patienten nur wenige Gene (*PPARA*, *HMGCS2*, *PCK1*) identifiziert, welche durch eine differenzielle Expression auf mögliche Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels im Roux-Schenkel im Vergleich zum Duodenum hindeuteten. Diese ersten Beobachtungen im humanen Gewebe eröffnen die Möglichkeit in künftigen Studien den Darm von RYGB-Patienten, insbesondere auf Proteinebene, bezüglich veränderter Cholesterol und Glukosestoffwechselwege und des erhöhten Energiebedarfs nach RYGB näher zu untersuchen.

Neben den Veränderungen im Energiestoffwechsel, deuteten die differenziell exprimierten Gene zwischen Roux-Schenkel und Duodenum der RYGB-Patienten vor allem auf veränderte Transportprozesse hin. Im Zusammenhang mit RYGB-

Operationen werden immer wieder die Auswirkungen auf die Pharmakokinetik von Arzneistoffen diskutiert⁷⁵⁻⁷⁷, so dass die potentiellen Expressionsänderungen von Arzneistofftransportern für die Pharmakotherapie nach RYGB durchaus von Interesse sind. Bis auf zwei Ausnahmen zeigte allerdings keines der relevanten Enzyme des Arzneistoffmetabolismus oder Arzneistofftransports^{201,202} Expressionsunterschiede zwischen Roux-Schenkel und Duodenum der Patienten. Lediglich der Effluxtransporter *ABCB1* wies im Roux-Schenkel eine leicht erhöhte Expression auf, während der Gallensäuretransporter *SLC10A2* als einziger von den näher untersuchten Transportern im Roux-Schenkel deutlich niedriger exprimiert war als im Duodenum. Da bekannt ist, dass Gallensäuren die Expression von *SLC10A2* induzieren²⁰³, könnte eine verminderte *SLC10A2* Expression im Roux-Schenkel darauf zurückzuführen sein, dass dieser nach der RYGB-Operation nicht mehr mit Gallensäuren in Berührung kommt.

Die weiteren zwischen Roux-Schenkel und Duodenum differenziell exprimierten Gene, die an Transportprozessen beteiligt sind, wiesen auf einen verstärkten Transport von Vitaminen bzw. Mikronährstoffen wie Ascorbinsäure (*SLC23A1*), Vitamin B12 (*CUBN*) und Zink (*SLC30A4*) im Roux-Schenkel hin. Zudem zeigte der Roux-Schenkel eine erhöhte Expression von *BCMO1*, *RDH11* und *LRAT*, welche auf eine verstärkte Vitamin A Synthese im Vergleich zum Duodenum hindeutete. Diese Beobachtung ist interessant, da die meisten RYGB-Patienten nach der Operation ausgeprägte Mikronährstoffdefizite aufweisen, die zum Großteil langfristig therapiert werden müssen¹⁷⁻¹⁹. Die beobachtete erhöhte Expression dieser Gene könnte darauf hindeuten, dass der Körper auf die Defizite, die nach der RYGB-Operation auftreten, reagiert und versucht diese zu kompensieren. Für *BCMO1* wurde bereits ein solcher Kompensationsprozess beschrieben. Lietz *et al.*²⁰⁴ zeigten, dass ein Vitamin A Defizit zu einer Erhöhung der intestinalen *BCMO1* mRNA-Expression führt, während deren Expression bei ausreichend Vitamin A reduziert wird.

Zusammengenommen deuten die mRNA-Expressionsprofile des Vergleichs von Roux-Schenkel und Duodenum darauf hin, dass es im ersten Jahr nach RYGB zu einer Verminderung von stressassoziierten Prozessen im jejunalen Gewebe des Roux-Schenkels kommt und sich der Roux-Schenkel insbesondere durch verstärkte metabolische Prozesse vom Duodenum zu unterscheiden scheint.

Interessanterweise zeigte sich auf der microRNA-Ebene ein völlig anderes Bild. Während sich das Jejunum, aus dem der Roux-Schenkel geformt wurde, vor der Operation deutlich in seinem microRNA-Expressionsprofil vom Duodenum unterschied (129 differenziell exprimierte microRNAs), zeigte der Roux-Schenkel ein Jahr nach der Operation keinerlei Unterschiede zum Duodenum. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sich der Roux-Schenkel im ersten Jahr nach RYGB in seinem microRNA-Expressionsprofil vollständig an das Duodenum adaptierte, dessen frühere anatomische Position er nun einnimmt. Bisher wurden nach RYGB nur Veränderungen zirkulierender microRNAs im Plasma von Ratten¹⁰³ und von RYGB-Patienten¹⁰⁴, sowie in den microRNA-Profilen in Hypothalamus und Herz von Ratten beschrieben¹⁰⁵. Somit legt diese Arbeit erstmals die Auswirkungen einer RYGB-Operation auf die microRNA-Expressionsprofile des oberen Dünndarms von RYGB-Patienten dar. Die Ursachen für die beobachtete Adaptation des Roux-Schenkels an das Duodenum auf Ebene der microRNA-Expression sind jedoch noch unklar. Allerdings kann angenommen werden, dass die Adaptationsprozesse im Roux-Schenkel durch veränderte Umwelteinflüsse verursacht oder zumindest begünstigt werden, die nach der RYGB-Operation im Darm auftreten, wie etwa der Kontakt mit unverdauter Nahrung⁹³ oder die Veränderungen des intestinalen Mikrobioms²⁰⁵. Um die kausalen Zusammenhänge allerdings im Detail aufzuklären, sind weiterführende Studien notwendig.

4.3 Roux-Schenkel vs. Jejunum – Adaptationsprozesse im jejunalen Gewebe nach RYGB

Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit galt dem Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum im Hinblick auf die molekularen Veränderungs- und Adaptationsprozesse im oberen Dünndarm nach einer RYGB-Operation. Da es sich bei dem Roux-Schenkel selbst um jejunales Gewebe handelte, aus dem während der Operation der Roux-Schenkel geformt wurde, konnten mit Hilfe dieses Vergleichs die Adaptationsprozesse auf Ebene der mRNA- und microRNA-Expressionsprofile im ersten Jahr nach einer RYGB-Operation analysiert werden. Da die Proben dem ursprünglich selben jejunalen Gewebe entstammten, ließen sich die beobachteten Veränderungs- und Adaptationsprozesse ausschließlich auf die Einflüsse eines durch den RYGB veränderten Gastrointestinaltrakts zurückführen.

Tatsächlich zeigte die Gegenüberstellung von Roux-Schenkel und Jejunum, im Gegensatz zu den beiden zuerst diskutierten Vergleichen, sowohl 68 differenziell exprimierte mRNAs als auch 111 differenziell exprimierte microRNAs. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass das jejunale Gewebe des Roux-Schenkels ein Jahr nach der RYGB-Operation nicht mehr dem ursprünglichen Jejunum entspricht, sondern sich auf molekularer Ebene verändert hat.

Die Expressionsunterschiede der 68 mRNAs deuteten an, dass die RYGB-Operation insbesondere zu Veränderungen von metabolischen Prozessen im Roux-Schenkel führt, was ebenfalls in dem Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum beobachtet wurde (siehe 4.2). So zeigte, bezogen auf den Cholesterolverstoffwechslung zeigte der Roux-Schenkel eine erhöhte Expression von *ACAT2*, welches an der Cholesterolspeicherung beteiligt ist ¹⁶⁷, während *APOC2*, dessen Protein als Koaktivator der Lipoproteinlipase fungiert ²⁰⁶, im Vergleich zum Jejunum deutlich niedriger exprimiert war. Die verminderte Expression von *APOC2* könnte darauf zurückgeführt werden, dass der Roux-Schenkel keinen Kontakt mehr mit Gallensäuren hat, welche die *APOC2* Expression induzieren ²⁰⁶. Zusätzlich wies das mRNA-Expressionsprofil des Roux-Schenkels insbesondere auf eine erhöhte Cholesterolsynthese (*HMGCR*, *CYP51A1*, *DHCR24*, *SC5DL*, *CYP7A1*) sowie auf eine verstärkte Regulation der Cholesterolverstoffwechslung (*STARD4*, *INSIG1*) gegenüber dem Jejunum hin.

Zusammengenommen entspricht diese Beobachtung des gesteigerten Cholesterolverstoffwechslung nach RYGB derjenigen aus dem Vergleich Roux-Schenkel vs. Duodenum (siehe 4.2). Dieses Ergebnis unterstützt somit die unter 4.2 aufgestellte Hypothese, dass der humane Dünndarm nach RYGB, wie bereits von Saeidi *et al.* ⁶³ für Ratten postuliert, einen erhöhten Energiebedarf aufweisen könnte, welcher auch durch Cholesterolverstoffwechslung gedeckt wird und somit zu metabolischen Verbesserungen nach einer RYGB-Operation beitragen könnte.

Interessanterweise zeigte der Roux-Schenkel im Vergleich zum Jejunum eine deutliche Herabregulation von *HMGCS2*, welches für das Schlüsselenzym der Ketogenese kodiert und der mRNA der Pyruvatdehydrogenase-Kinase 4 (*PDK4*), welche den Pyruvatdehydrogenase-Komplex kontrolliert, der die Glykolyse mit dem Zitratzyklus verbindet. Für beide Gene wurden positive Assoziationen mit

Insulinresistenz und Diabetes beschrieben, wobei die Pyruvatdehydrogenase-Kinasen bereits als mögliche Zielstrukturen für die Entwicklung von Inhibitoren diskutiert werden, die zur Behandlung von metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt werden könnten^{207,208}. Zwar wurde im Zusammenhang mit RYGB eine veränderte Expression und Methylierung von PDK4 in Muskelzellen beschrieben²⁰⁹, allerdings sind weiterführende Studien notwendig, um die kausalen Zusammenhänge zwischen RYGB-Operation, Gewichtsverlust, Verbesserung des Diabetes und Veränderung der intestinalen PDK4 Expression aufzuklären.

In der Literatur wird im Bezug auf Veränderungen des Glukosestoffwechsels nach RYGB und einer möglichen Verbesserung der metabolischen Situation immer wieder eine verminderte Glukoseabsorption und die veränderte Expression relevanter intestinaler Glukosetransporter (GLUT-2, SGLT-1) diskutiert⁷⁸. Obwohl sich viele der 68 zwischen Roux-Schenkel und Jejunum differenziell exprimierten mRNAs der RYGB-Patienten Transportprozessen zuordnen ließen, zeigten beide Gewebe interessanterweise keinerlei Expressionsunterschiede dieser Glukosetransporter. Dies entspricht der Beobachtung aus dem Tiermodell, in dem ebenfalls keine veränderte Expression von *GLUT-2* und *SGLT-1* nach RYGB gefunden wurde^{63,102}. Demgegenüber beschrieben etwa Nguyen *et al.*¹⁰¹ im Darm von Patienten nach RYGB erhöhte Expressionswerte für diese Glukosetransporter. Aufgrund dieser uneinheitlichen Datenlage sind auch hier weiterführende Studien notwendig, um die Auswirkungen einer RYGB-Operation auf den intestinalen Glukosetransport abschließend zu klären.

Im Weiteren stehen auch die Darmhormone PYY und GLP-1 stehen in der Diskussion als mögliche Mediatoren für die metabolischen Verbesserungen nach RYGB²¹. Allerdings betrachten die meisten Studien nur den Anstieg ihrer Plasmaspiegel nach RYGB²⁹⁻³² und lassen die mögliche mRNA-Expressionsänderung im Darm außer acht. Um zu untersuchen, ob der obere Dünndarm zu den erhöhten Plasmaspiegeln beiträgt, wurde die mRNA-Expression von *PYY* und *Proglukagon*, welches unter anderem für GLP-1 kodiert, in den Patientenproben der vorliegenden Arbeit analysiert. Der Roux-Schenkel wies weder im Vergleich zum Jejunum noch zum Duodenum Expressionsunterschiede auf, was auch schon von Rhee *et al.*⁹⁸ in Darmbiopsien von RYGB-Patienten gezeigt wurde.

Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass die L-Zellen, welche *PYY* und *Proglukagon* exprimieren^{210,211}, hauptsächlich im terminalen Ileum, Kolon und Rektum zu finden sind²¹² und somit eine veränderte Expression der Hormone nach RYGB wahrscheinlich eher in distaleren Bereichen des Darms zu erwarten ist.

Dagegen zeigte der Roux-Schenkel gegenüber dem Jejunum, wie auch schon gegenüber dem Duodenum beobachtet, Expressionsunterschiede von Genen, die auf Veränderungen im Transport und in der Synthese von Vitaminen und Mikronährstoffen hinwiesen. So zeigte der Gallensäuretransporter *SLC10A2* auch gegenüber dem Jejunum eine verminderte Expression, welche auf den Wegfall der Gallensäureexposition zurückgeführt werden könnte (vergleiche 4.2). Ebenso deutete die erhöhte Expression von *CUBN* auf einen verstärkten Vitamin B12 Transport im Roux-Schenkel und die Änderung der Expressionswerte von *BCMO1*, *RDH11* und *LRAT* auf eine erhöhte Vitamin A Synthese gegenüber dem Jejunum hin.

Diese letztgenannte Beobachtung zur Vitamin A Synthese ist besonders interessant, da Vitamin A bzw. der Metabolit Retinsäure bereits als wichtiger Faktor für die intestinale Mukosastruktur und Adaptation bei Kurzdarm-Syndrom-Patienten identifiziert wurde^{90,92}. Bei Vitamin A Defiziten wurde eine verminderte intestinale Adaptation beobachtet⁹¹. Die Retinsäure fungiert als Signalmolekül, welches eine gewebespezifische Lokalisation und funktionelle Polarisierung²¹³ induzieren und somit den Prozess der Anpassung an bestimmte Gewebe unterstützen kann. Vor diesem Hintergrund könnte die erhöhte Vitamin A Synthese im Roux-Schenkel eine wichtige Rolle für die intestinalen Adaptations- und Veränderungsprozesse spielen, die offensichtlich innerhalb des ersten Jahres nach der Operation im oberen Dünndarm der RYGB-Patienten abliefen. Zudem zeigten Studien in Mäusen, dass *BCMO1*, das Schlüsselenzym der Vitamin A Synthese, einen positiven Effekt auf den Lipidstoffwechsel hat und zu einer Reduktion der Adipositas führt^{214,215}, während *BCMO1*-defiziente Mäuse eine Dyslipidämie und eine verstärkte diätinduzierte Adipositas entwickeln²¹⁶. Auf Grund dieser Beobachtungen stellte sich die Frage, ob erhöhte *BCMO1*-Spiegel nach der RYGB-Operation ebenfalls zu den metabolischen Verbesserungen der RYGB-Patienten beitragen könnten. Zwar konnte diese Frage in der vorliegenden Arbeit nicht vollständig geklärt werden, aber die zur Verfügung stehenden Daten aus der Literatur und die Ergebnisse dieser Arbeit, welche eine

erhöhte *BCMO1*-Expression im Roux-Schenkel zeigten, legen eine entsprechende Annahme nahe. Diese Daten können somit als Grundlage für folgende Analysen dienen, welche den Anteil von Genen der Vitamin A Synthese an den Veränderungen und metabolischen Verbesserungen nach RYGB weiter aufklären.

Im Weiteren war in dieser Arbeit von Interesse, welche regulatorischen Mechanismen den beschriebenen molekularen Veränderungen im jejunalen Gewebe nach RYGB zu Grunde liegen könnten. So stellte sich die Frage, ob eine posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs an den Veränderungen des jejunalen Gewebes auf mRNA-Ebene beteiligt sein könnte, insbesondere da bei Kurzdarm-Syndrom-Patienten bereits eine microRNA-vermittelte Regulation intestinaler Adaptationsprozesse beschrieben wurde¹¹⁴. Durch die Korrelationsanalyse wurden neun negativ korrelierte und experimentell validierte microRNA-mRNA-Interaktionen identifiziert, deren regulierte Gene am Energiestoffwechsel (*SCD*), an der Cholesterolumöostase (*DHCR24*, *INSIG1*) und interessanterweise auch an der Vitamin A Synthese beteiligt sind (*RDH11*). Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit die vorhergesagte Interaktion von miR-301a mit *BCMO1*, dem Schlüsselenzym der Vitamin A Synthese, verifiziert (siehe 3.4). Es wurde erstmals nachgewiesen, dass miR-301a über zwei Bindestellen an die *BCMO1*-3'-UTR bindet und dadurch in der Lage ist, den *BCMO1*-Proteingehalt signifikant zu reduzieren. Über diese posttranskriptionelle Regulation durch miR-301a können somit die bei den RYGB-Patienten beobachteten Expressionswerte von *BCMO1* erklärt werden. Während das Jejunum der Patienten vor der Operation eine niedrige *BCMO1*-Expression zusammen mit einer höheren miR-301a-Expression aufwies, zeigte der Roux-Schenkel ein Jahr nach der Operation hohe *BCMO1*-Expressionswerte und reduzierte Werte für miR-301a. Diese Ergebnisse weisen erstmalig darauf hin, dass microRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren an den molekularen Veränderungen des jejunalen Gewebes des Roux-Schenkels nach einer RYGB-Operation, insbesondere an den Veränderungen des Energiestoffwechsels sowie der Vitamin A Synthese, beteiligt sein können.

Die veränderten microRNA-Expressionsmuster im Roux-Schenkel werden allerdings nicht die alleinige Ursache für die intestinalen Veränderungs- und Adaptationsprozesse auf mRNA-Ebene darstellen. Vielmehr sind die microRNAs ein Glied in einer Kette von regulatorischen Mechanismen, die durch die Veränderungen im

Mikroumfeld des Darms nach RYGB beeinflusst werden. Zu solchen Veränderungen, welche Einfluss auf die Expressionsprofile im Roux-Schenkel haben können, wird die Änderung des intestinalen Mikrobioms^{49,50,100} gezählt. Auch wird angenommen, dass der Kontakt mit unverdauter Nahrung^{63,93,97} einen Einfluss auf das Expressionsprofil des Roux-Schenkels hat. Der Roux-Schenkel kommt nach der RYGB-Operation vermehrt mit unverdauter Nahrung in Berührung, da er durch die gastro-jejunale Anastomose keinen Kontakt mehr zu Verdauungsenzymen und Gallensäuren hat. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, inwieweit auch der Wegfall der Gallensäureexposition die Expressionsprofile im Roux-Schenkel beeinflussen könnte, insbesondere da die Funktion von Gallensäuren als Signalmoleküle bekannt ist^{34,44,45}.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit erstmals in einem *in-vitro* Experiment der Einfluss des Gallensäurekontaktes bzw. der Wegfall der Gallensäureexposition am Beispiel von miR-301a und *BCMO1* untersucht. Der Gallensäurekontakt führte tendenziell zu einer leicht erhöhten Expression von miR-301a. In Bezug auf die *BCMO1*-mRNA wurde kein deutlicher Einfluss der Gallensäuren in den CaCo2-Zellen beobachtet, während die *BCMO1* mRNA-Expression *in-vivo* nach Wegfall des Gallensäurekontaktes im Roux-Schenkel deutlich erhöht war. Diese Diskrepanz zwischen Zellexperiment und Patientenproben ist wahrscheinlich damit zu erklären, dass es sich bei CaCo2 Zellen zwar um das meistverwendete und am besten beschriebene Zellmodell für den humanen Dünndarm handelt²¹³, welches aber in der Expression einiger Gene Unterschiede zum humanen Gewebe aufweist^{214,215}. Im Zellexperiment wurde unter Cholsäurekontakt allerdings eine signifikante Herabregulation des *BCMO1*-Proteingehaltes gefunden, welche den Beobachtungen aus den Patientenproben gleicht, auch wenn nur der Vergleich mit der mRNA-Expression möglich ist. Da für Gallensäuren bekannt ist, dass sie die Expression von Genen über die Bindung an nukleäre Rezeptoren regulieren können²¹⁷, wurden die Promotorregionen von *BCMO1* und miR-301a *in-silico* nach möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen durchsucht. Interessanterweise wies nur die Promotorregion von miR-301a putative Bindestellen für die folgenden Transkriptionsfaktoren auf, für die bereits in der Literatur eine Regulation durch Gallensäuren beschrieben wurde, nämlich für LXR,¹⁷⁷ PXR¹⁷⁷, CAR¹⁷⁸ und VDR¹⁷⁹. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei der Regulation von *BCMO1* durch

Gallensäuren um einen microRNA-vermittelten Mechanismus handeln könnte, welcher im Detail noch weiter aufgeklärt werden muss. Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse aus dem Versuch mit Gallensäuren darauf hin, dass der Wegfall der Gallensäureexposition im Roux-Schenkel als ein weiterer wichtiger Faktor des veränderten Mikroumfelds im oberen Darm nach RYGB angesehen werden muss, welcher zu den beobachteten molekularen Veränderungen beitragen kann.

4.4 Fazit

Zusammenfassend handelte es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Untersuchung, welche die Frage molekularer Veränderungs- und Adaptationsprozesse im oberen Dünndarm von Patienten nach einer Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation adressiert. Die Ergebnisse der genomweiten mRNA- und microRNA-Expressionsmuster deuten an, dass der Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB weder dem ursprünglichen Jejunum entspricht, noch mit dem Duodenum vor RYGB verglichen werden kann. Vielmehr sollte der Roux-Schenkel als deutlich verändertes Gewebe angesehen werden, dessen microRNA-Expressionsmuster interessanterweise denen des Duodenums entsprechen. Charakterisiert wird der Roux-Schenkel insbesondere durch die Expression von Genen, welche auf veränderte metabolische Prozesse hindeuten, inklusive eines verstärkten Cholesterollowerstandes, Veränderungen einzelner Gene des Glukosestoffwechsels, eines erhöhten Transports von Vitaminen und Mikronährstoffen und einer erhöhten Vitamin A Synthese. BCMO1, das Schlüsselenzym der Vitamin A Synthese, konnte als ein potentieller Faktor für die intestinale Adaptation identifiziert werden, der einer posttranskriptionellen Regulation durch miR-301a unterliegt. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der Wegfall des Kontaktes mit Cholsäure BCMO1 deutlich beeinflusst. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die verminderte Gallensäureexposition im Roux-Schenkel nach der jejunalen Transposition zu den beobachteten molekularen Veränderungen nach RYGB beitragen kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit erstmals, die infolge einer RYGB-Operation auftretenden intestinalen Veränderungs- und Adaptationsprozesse auf molekularer Ebene, sowie regulatorische Mechanismen durch microRNAs und Gallensäuren, die zu diesen Veränderungen beitragen können. In Zukunft können die Daten dieser Arbeit als

Grundlage für weiterführende Studien dienen, welche die Beteiligung des Darms an den metabolischen Verbesserungen der RYGB-Patienten im Detail weiter untersuchen.

5 Zusammenfassung

Bei stark adipösen Patienten, deren Anzahl weltweit kontinuierlich steigt, stellen bariatrische Operationen häufig die einzige Möglichkeit für eine effektive und langfristige Gewichtsreduktion dar. Das weltweit am häufigsten angewendete Verfahren ist der Roux-en-Y-Magen-Bypass (RYGB), der zusätzlich zur Gewichtsreduktion zur Verbesserung von mit Übergewicht assoziierten Komorbiditäten, wie Diabetes mellitus Typ 2, Hypertonie oder Dyslipidämie führt und somit positiv auf den gesamten Gesundheitsstatus der Patienten wirkt. Die Prozesse, die diesen metabolischen Verbesserungen zu Grunde liegen, sind bisher erst wenig verstanden. Zwar werden der Einfluss von Darmhormonen und Gallensäuren, sowie Veränderungen des intestinalen Mikrobioms, des Energieumsatzes, der neuro-endokrinen Signalübertragung und der Nahrungsmittelauswahl als mögliche Ursachen diskutiert, allerdings ist zum heutigen Zeitpunkt unklar, in welchem Maße diese Mechanismen im Patienten zur Verbesserung der metabolischen Situation beitragen. Obwohl der Gastrointestinaltrakt unmittelbar von der RYGB-Operation betroffen ist, wurden die Auswirkungen einer solchen Operation auf den oberen Dünndarm von Patienten bisher erst in wenigen Studien untersucht. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein besseres Verständnis für die Konsequenzen einer RYGB-Operation auf den oberen menschlichen Dünndarm zu erlangen. Im Zentrum dieser Arbeit stand die Frage, in welchem Maße eine Roux-en-Y-Magen-Bypass-Operation zu molekularen Veränderungs- und Adaptationsprozessen im oberen menschlichen Dünndarm führt und über welche Mechanismen diese Prozesse reguliert werden könnten.

Als Grundlage für diese Untersuchungen standen intestinale Gewebebiopsien von zwölf RYGB-Patienten zur Verfügung, die aus dem Duodenum und dem Jejunum jeweils vor der Operation und aus dem Roux-Schenkel, welcher aus dem Jejunum geformt wurde, ein Jahr nach der Operation entnommen wurden. In diesen Gewebebiopsien wurden die genomweiten mRNA- und microRNA-Expressionsmuster mit Micoarray und qRT-PCR-Methoden vermessen, um Unterschiede in den Expressionsprofilen der drei Gewebe zu identifizieren. Für differenziell exprimierte mRNAs wurden *Gene Ontology* (GO)-Term-Analysen

durchgeführt, um diese Stoffwechselwegen zuordnen zu können. Zudem wurde untersucht, ob microRNAs als posttranskriptionelle Regulatoren an den beobachteten Expressionsänderungen auf mRNA-Ebene beteiligt sein könnten. Hierfür wurden, nach Korrelationsanalysen und *in-silico* Zielgen-Vorhersagen für potentielle microRNA-mRNA-Paare Interaktionen mittels Reporter-gen-Assay und Western-Blot Analyse nachgewiesen. Der Einfluss von Gallensäuren als regulatorische Umweltfaktoren wurde in einem *in-vitro* Experiment näher analysiert.

Die Analyse der genomweiten Expressionsmuster deutet an, dass sich Jejunum und Duodenum vor der RYGB-Operation wenig in ihren mRNA-Expressionsprofilen unterscheiden, während sich beide vom Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB unterscheiden. Der Roux-Schenkel kann ein Jahr nach RYGB eher als deutlich verändertes Gewebe angesehen werden, dessen microRNA-Expressionsmuster interessanterweise denen des Duodenums entsprechen. Er wird gegenüber dem oberen Dünndarm vor der RYGB-Operation durch die Expression von Genen charakterisiert, die auf verstärkte metabolische Prozesse wie einen verstärkten Cholesterollowerstand, einen erhöhten Transport von Vitaminen und Mikronährstoffen und eine erhöhte Vitamin A Synthese hindeuten. Im Verlauf dieser Arbeit konnte BCMO1, das Schlüsselenzym der Vitamin A Synthese, als ein potentieller Faktor für die intestinalen Veränderungs- und Adaptationsprozesse identifiziert werden, der einer posttranskriptionellen Regulation durch miR-301a unterliegt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Wegfall des Kontaktes mit Cholsäure BCMO1 beeinflusste, was darauf hindeutet, dass die verminderte Gallensäureexposition im Roux-Schenkel nach der jejunalen Transposition zu den beobachteten molekularen Veränderungen beitragen kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals die infolge einer RYGB-Operation auftretenden intestinalen Veränderungs- und Adaptationsprozesse auf molekularer Ebene im Patienten auf. Sie weisen auf regulatorische Mechanismen durch microRNAs und Gallensäuren hin, die zu diesen Veränderungen beitragen können. In Zukunft können die Daten dieser Arbeit als Grundlage für Folgestudien dienen, welche die Beteiligung des Darms an den metabolischen Verbesserungen der RYGB-Patienten im Detail weiter untersuchen, ohne das Problem der Übertragbarkeit von Beobachtungen aus dem Tiermodell adressieren zu müssen. Ein besonderer Fokus der Folgestudien sollte auf Regulationsmechanismen und die

darüber veränderte Proteinmenge, sowie auf die Untersuchung der metabolischen Profile des Gastrointestinaltraktes gelegt werden.

Summary

The number of morbid obese patients is continuously increasing worldwide. For those patients bariatric surgery often provides the only alternative to achieve substantial and sustained weight loss. The most frequently used procedure is the Roux-en-Y-gastric-bypass (RYGB), which leads beside the weight reduction to sustained improvement or even remission of comorbidity associated with obesity like diabetes mellitus type 2, hypertension or dyslipidemia and thus has a positive impact on the overall health status of patients. The mechanisms underlying these metabolic improvements are only poorly understood. The influence of gut hormones and bile acids, as well as changes in the intestinal microbiome, energy expenditure, neuroendocrine signaling and food preference are discussed as possible causes, however, at the present time it is not clear to what extent those mechanisms contribute to the metabolic benefit of the RYGB. Although the gastrointestinal tract is directly affected by the RYGB surgery, the impact of surgery has been studied in the intestine of patients in only a few studies. Therefore the aim of this work was to better understand the consequences of a RYGB surgery on the human upper small intestine. This work focused on the question to what extent a Roux-en-Y gastric bypass surgery leads to molecular changes and adaptation processes in the upper small intestine and which mechanisms might regulate these processes.

As basis for these studies intestinal tissue biopsies from twelve RYGB patients were available, taken from the duodenum, jejunum prior to surgery and from the Roux limb, which was formed from the jejunum, one year after surgery. The genome wide mRNA and microRNA expression patterns of these biopsies were determined with Microarray and qRT-PCR methods to identify differences in the expression profiles of the three tissues. For differentially expressed mRNAs Gene Ontology (GO)-term analyzes were conducted in order to assign them to over-represented pathways. Additionally, it was investigated whether microRNAs as post-transcriptional regulators might be involved in the observed expression changes on mRNA level. Therefore, after identifying potential microRNA-mRNA pairs by correlation analysis and in silico target gene prediction, the interactions were confirmed using reporter

gene assays and western blot analysis. The influence of bile acids as regulatory environmental factors was analyzed in detail in an *in vitro* experiment. The analysis of genome wide expression patterns suggests that jejunum and duodenum differ only little before RYGB in their mRNA expression profiles, while both differ considerably from Roux limb one year after RYGB. The Roux limb one year after RYGB could be considered as a "new tissue", whose microRNA expression profile corresponds interestingly to those of the duodenum. The Roux limb is characterized by gene expression, indicating enhanced metabolic processes, such as increased cholesterol metabolism, increased transport of vitamins and micronutrients and increased vitamin A synthesis. During this work BCMO1, the key enzyme of vitamin A synthesis, was identified as a potential factor for the intestinal changes and adaptation processes, which is posttranscriptional regulated by miR-301a. In addition, it was shown that the absence of contact with cholic acid significantly affected BCMO1, suggesting that the reduced bile acid exposure in the Roux-limb after jejunal transposition may contribute to the observed molecular changes.

The results of this thesis show for the first time intestinal changes and adaptation processes at molecular level in patients, which occur as consequence of a RYGB surgery, as well as regulatory mechanisms through microRNAs and bile acids, which may contribute to these changes. In the future, data of this work could serve as basis for follow-up studies for investigating the involvement of the intestine to the metabolic improvements of RYGB patients more in detail without the problem of translating observations from animal models to patients. A special focus of the follow-up studies should be placed on regulatory mechanisms and altered protein expression, as well as on the investigation of metabolic profiles of gastrointestinal tract.

6 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the global epidemic. *WHO Technical Report Series* 894 2000; :1–268.
2. Kurth B-M. Erste Ergebnisse aus der „Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland“ (DEGS). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 2012; 55:980–90.
3. Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) e.V., Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG), Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) e.V., Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin (DGEM) e.V. S3-Leitlinie Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur „Prävention und Therapie der Adipositas“. 2014; Version 2.0 (April 2014)
4. Knoll KP, Hauner H. Kosten der Adipositas in der Bundesrepublik Deutschland - Eine aktuelle Krankheitskostenstudie. *Adipositas – Ursachen, Folgeerkrankungen, Therapie* 2008; 2:204–10.
5. Fischer-Posovszky P, Schnurbein von J, Moepps B, Lahr G, Strauss G, Barth TF, Kassubek J, Mühleder H, Möller P, Debatin K-M, Gierschik P, Kassubek J. A New Missense Mutation in the Leptin Gene Causes Mild Obesity and Hypogonadism without Affecting T Cell Responsiveness. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010; 95:2836–40.
6. World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *WHO Technical Report Series* 916 2003; 1-149.
7. Wirth A, Hauner H. Adipositas. *Springer*; 2013.
8. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DCW. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *British Medical Journal* 2007; 335:1194–9.
9. Buchwald H, Oien DM. Metabolic/Bariatric Surgery Worldwide 2008. *Obesity Surgery* 2009; 19:1605–11.
10. Buchwald H, Oien DM. Metabolic/Bariatric Surgery Worldwide 2011. *Obesity Surgery* 2013; 23:427–36.
11. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Medical Association* 2004; 292:1724–37.
12. Sjöström L, Lindroos A-K, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B, Dahlgren S, Larsson B, Narbro K, Sjöström CD, Sullivan M, Wedel H. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *New England Journal of Medicine* 2004; 351:2683–93.

13. Dixon JB, McPhail T. Minimal Reporting Requirements for Weight Loss: Current Methods Not Ideal. *Obesity Surgery* 2005; 15:1034-39.
14. Maggard MA, Shugarman LR, Suttorp M, Maglione M, Sugerman HJ, Sugarman HJ, Livingston EH, Nguyen NT, Li Z, Mojica WA, Hilton L, Rhodes S, Morton SC, Shekelle PG. Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Annals of Internal Medicine* 2005; 142:547-59.
15. Shi X, Karmali S, Sharma AM, Birch DW. A Review of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy for Morbid Obesity. *Obesity Surgery* 2010; 20:1171-7.
16. Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG), Deutsche Gesellschaft für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie, Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin. S3-Leitlinie: Chirurgie der Adipositas. 2010
17. Griffith PS, Birch D, Sharma A, Karmali S. Managing complications associated with laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. *Canadian Journal of Surgery* 2012; 55:329-36.
18. Tack J, Deloose E. Complications of bariatric surgery: Dumping syndrome, reflux and vitamin deficiencies. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2014; 28:741-9.
19. Sawaya RA, Jaffe J, Friedenberg L, Friedenberg FK. Vitamin, mineral, and drug absorption following bariatric surgery. *Current Drug Metabolism* 2012; 13:1345-55.
20. Puziferri N, Roshek TB III, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term Follow-up After Bariatric Surgery. *Journal of the American Medical Association* 2014; 312:934-42
21. Lutz TA, Bueter M. The physiology underlying Roux-en-Y gastric bypass: a status report. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2014; 307:R1275-91.
22. Wickremesekera K, Miller G, Naotunne TD, Knowles G, Stubbs RS. Loss of insulin resistance after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a time course study. *Obesity Surgery* 2005; 15:474-81.
23. Dirksen C, Joergensen NB, Bojsen-Moeller KN, Kielgast U, Jacobsen SH, Clausen TR, Worm D, Hartmann B, Rehfeld JF, Damgaard M, Madsen JL, Madsbad S, Holst JJ, Hansen DL. Gut hormones, early dumping and resting energy expenditure inpatients with good and poor weight loss response after Roux-en-Ygastric bypass. *International Journal of Obesity* 2013; 37:1452-9.
24. Pournaras DJ, le Roux CW. After bariatric surgery, what vitamins should be measured and what supplements should be given? *Clinical Endocrinology* 2009; 71:322-5.

25. Miras AD, le Roux CW. Mechanisms underlying weight loss after bariatric surgery. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2013; 10:575–84.
26. Stefater MA, Wilson-Pérez HE, Chambers AP, Sandoval DA, Seeley RJ. All Bariatric Surgeries Are Not Created Equal: Insights from Mechanistic Comparisons. *Endocrine Reviews* 2012; 595-622.
27. Sweeney T, Morton JM. Metabolic surgery: Action via hormonal milieu changes, changes in bile acids or gut microbiota? A summary of the literature. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2014; 28:727–40.
28. Batterham RL, Cowley MA, Small CJ, Herzog H, Cohen MA, Dakin CL, Wren AM, Brynes AE, Low MJ, Ghatei MA, Cone RD, Bloom SR. Physiology: Does gut hormone PYY3–36 decrease food intake in rodents? (reply). *Nature* 2004; 430.
29. le Roux CW, Welbourn R, Werling M, Osborne A, Kokkinos A, Laurenus A, Lönroth H, Fändriks L, Ghatei MA, Bloom SR, Olbers T. Gut Hormones as Mediators of Appetite and Weight Loss After Roux-en-Y Gastric Bypass. *Annals of Surgery* 2007; 246:780–5.
30. Peterli R, Wölnerhanssen B, Peters T, Devaux N, Kern B, Christoffel-Courtin C, Drewe J, Flüe von M, Beglinger C. Improvement in Glucose Metabolism After Bariatric Surgery: Comparison of Laparoscopic Roux-en-Y Gastric Bypass and Laparoscopic Sleeve Gastrectomy. *Annals of Surgery* 2009; 250:234–41.
31. Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Sigalet DL, Berthoud H-R. Meal-Induced Hormone Responses in a Rat Model of Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery. *Endocrinology* 2010; 151:1588–97.
32. Chandarana K, Gelegen C, Karra E, Choudhury AI, Drew ME, Fauveau V, Viollet B, Andreelli F, Withers DJ, Batterham RL. Diet and Gastrointestinal Bypass-Induced Weight Loss: The Roles of Ghrelin and Peptide YY. *Diabetes* 2011; 60:810–8.
33. Panaro BL, Tough IR, Engelstoft MS, Matthews RT, Digby GJ, Møller CL, Svendsen B, Gribble F, Reimann F, Holst JJ, Holst B, Schwartz TW, Cox HM, Cone RD. The Melanocortin-4 Receptor Is Expressed in Enteroendocrine L Cells and Regulates the Release of Peptide YY and Glucagon-like Peptide 1 In Vivo. *Cell Metabolism* 2014; 20:1018–29.
34. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakı C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K. TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. *Cell Metabolism* 2009; 10:167–77.

35. Roux CWL, Aylwin SJB, Batterham RL, Borg CM, Coyle F, Prasad V, Shurey S, Ghatei MA, Patel AG, Bloom SR. Gut Hormone Profiles Following Bariatric Surgery Favor an Anorectic State, Facilitate Weight Loss, and Improve Metabolic Parameters. *Annals of Surgery* 2006; 243:108–14.
36. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, Tran H, Egger JR, Colarusso A, Kovack B, Bawa B, Koshy N, Lee H, Yapp K, Olivan B. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008; 93:2479–85.
37. Zheng H, Shin AC, Lenard NR, Townsend RL, Patterson LM, Sigalet DL, Berthoud HR. Meal patterns, satiety, and food choice in a rat model of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2009; 297:R1273–82.
38. Abegg K, Schiesser M, Lutz TA, Bueter M. Acute peripheral GLP-1 receptor agonism or antagonism does not alter energy expenditure in rats after Roux-en-Y gastric bypass. *Physiology & Behavior* 2013; 121:70–8.
39. Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganolipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D, Bekker JHR, Ghatei MA, Bloom SR, Walters JRF, Welbourn R, le Roux CW. The Role of Bile After Roux-en-Y Gastric Bypass in Promoting Weight Loss and Improving Glycaemic Control. *Endocrinology* 2012; 153:3613–9.
40. Simonen M, Dali-Youcef N, Kaminska D, Venesmaa S, Käkelä P, Pääkkönen M, Hallikainen M, Kolehmainen M, Uusitupa M, Moilanen L, Laakso M, Gylling H, Patti ME, Auwerx J, Pihlajamäki J. Conjugated Bile Acids Associate with Altered Rates of Glucose and Lipid Oxidation after Roux-en-Y Gastric Bypass. *Obesity Surgery* 2012; 22:1473–80.
41. Ahmad NN, Pfalzer A, Kaplan LM. Roux-en-Y gastric bypass normalizes the blunted postprandial bile acid excursion associated with obesity. *International Journal of Obesity* 2013; 37:1553–9.
42. Kohli R, Setchell KD, Kirby M, Myronovych A, Ryan KK, Ibrahim SH, Berger J, Smith K, Toure M, Woods SC, Seeley RJ. A Surgical Model in Male Obese Rats Uncovers Protective Effects of Bile Acids Post-Bariatric Surgery. *Endocrinology* 2013; 154:2341–51.
43. de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metabolism* 2013; 17:657–69.
44. Watanabe M, Houten SM, Mataka C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006; 439:484–9.

45. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiological Reviews* 2009; 89:147–91.
46. Degirolamo C, Rainaldi S, Bovenga F, Murzilli S, Moschetta A. Microbiota Modification with Probiotics Induces Hepatic Bile Acid Synthesis via Downregulation of the Fxr-Fgf15 Axis in Mice. *Cell Reports* 2014; 7:12–8.
47. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489:242–9.
48. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444:1027–131.
49. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009; 106:2365–70.
50. Furet JP, Kong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A, Bouillot JL, Mariat D, Corthier G, Doré J, Henegar C, Rizkalla S, Clement K. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery-Induced Weight Loss: Links With Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. *Diabetes* 2010; 59:3049–57.
51. Li JV, Ashrafian H, Bueter M, Kinross J, Sands C, le Roux CW, Bloom SR, Darzi A, Athanasiou T, Marchesi JR, et al. Metabolic surgery profoundly influences gut microbial-host metabolic cross-talk. *Gut* 2011; 60:1214–23.
52. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM, Machineni S, Turnbaugh PJ, Kaplan LM. Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Science Translational Medicine* 2013; 5:178ra141PB.
53. Werling M, Olbers T, Fändriks L, Bueter M, Lönroth H, Stenlöf K, le Roux CW. Increased Postprandial Energy Expenditure May Explain Superior Long Term Weight Loss after Roux-en-Y Gastric Bypass Compared to Vertical Banded Gastroplasty. *PLoS ONE* 2013; 8:e60280.
54. Bueter M, Löwenstein C, Olbers T, Wang M, Cluny NL, Bloom SR, Sharkey KA, Lutz TA, le Roux CW. Gastric Bypass Increases Energy Expenditure in Rats. *YGAST* 2010; 138:1845–1853.e1.
55. Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, German J, Fischer JD, Ogimoto K, Schwartz MW. Fibroblast Growth Factor 21 Action in the Brain Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes* 2010; 59:1817–24.

56. Hankir M, Bueter M, Gsell W, Seyfried F, Khalil M, Smith KL, Bloom SR, Bell JD, le Roux CW. Increased Energy Expenditure in Gastric Bypass Rats Is Not Caused by Activated Brown Adipose Tissue. *Obesity Facts* 2012; 5:349–58.
57. Shin AC, Zheng H, Townsend RL, Patterson LM, Holmes GM, Berthoud H-R. Longitudinal Assessment of Food Intake, Fecal Energy Loss, and Energy Expenditure After Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery in High-Fat-Fed Obese Rats. *Obesity Surgery* 2012; 23:531–40.
58. Stylopoulos N, Hoppin AG, Kaplan LM. Roux-en-Y Gastric Bypass Enhances Energy Expenditure and Extends Lifespan in Diet-induced Obese Rats. *Obesity* 2012; 17:1839–47.
59. Saeidi N, Nestoridi E, Kucharczyk J, Uygun MK, Yarmush ML, Stylopoulos N. Sleeve gastrectomy and Roux-en-Y gastric bypass exhibit differential effects on food preferences, nutrient absorption and energy expenditure in obese rats. *International Journal of Obesity* 2012; 36:1396–402.
60. Wang G, Agenor K, Pizot J, Kotler DP, Harel Y, Van Der Schueren BJ, Quercia I, McGinty J, Laferrère B. Accelerated Gastric Emptying but No Carbohydrate Malabsorption 1 Year After Gastric Bypass Surgery (GBP). *Obesity Surgery* 2012; 22:1263–7.
61. Carrasco F, Papapietro K, Csendes A, Salazar G, Echenique C, Lisboa C, Díaz E, Rojas J. Changes in Resting Energy Expenditure and Body Composition after Weight Loss following Roux-en-Y Gastric Bypass. *Obesity Surgery* 2007; 17:608–16.
62. Thivel D, Brakoniek K, Duche P, Béatrice M, Yves B, Laferrère B. Surgical Weight Loss: Impact on Energy Expenditure. *Obesity Surgery* 2012; 23:255–66.
63. Saeidi N, Meoli L, Nestoridi E, Gupta NK, Kvas S, Kucharczyk J, Bonab AA, Fischman AJ, Yarmush ML, Stylopoulos N. Reprogramming of Intestinal Glucose Metabolism and Glycemic Control in Rats After Gastric Bypass. *Science* 2013; 341:406–10.
64. Ernst B, Thurnheer M, Wilms B, Schultes B. Differential Changes in Dietary Habits after Gastric Bypass Versus Gastric Banding Operations. *Obesity Surgery* 2008; 19:274–80.
65. Miras AD, Jackson RN, Jackson SN, Goldstone AP, Olbers T, Hackenberg T, Spector AC, le Roux CW. Gastric bypass surgery for obesity decreases the reward value of a sweet-fat stimulus as assessed in a progressive ratio task. *American Journal of Clinical Nutrition* 2012; 96:467–73.

66. Bueter M, Miras AD, Chichger H, Fenske W, Ghatel MA, Bloom SR, Unwin RJ, Lutz TA, Spector AC, le Roux CW. Alterations of sucrose preference after Roux-en-Y gastric bypass. *Physiology & Behavior* 2011; 104:709–21.
67. Mathes CM, Spector AC. Food selection and taste changes in humans after Roux-en-Y gastric bypass surgery: A direct-measures approach. *Physiology & Behavior* 2012; 107:476–83.
68. Hatoum IJ, Stylopoulos N, Vanhoose AM, Boyd KL, Yin DP, Ellacott KLJ, Ma LL, Blaszczyk K, Keogh JM, Cone RD, Farooqi S, Kaplan LM. Melanocortin-4 Receptor Signaling Is Required for Weight Loss after Gastric Bypass Surgery. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012; 97:E1023–31.
69. Romanova IV, Ramos EJB, Xu Y, Quinn R, Chen C, George ZM, Inui A, Das U, Meguid MM. Neurobiologic changes in the hypothalamus associated with weight loss after gastric bypass. *Journal of the American College of Surgeons* 2004; 199:887–95.
70. Steele KE, Prokopowicz GP, Schweitzer MA, Magunson TH, Lidor AO, Kuwabawa H, Kumar A, Brasic J, Wong DF. Alterations of Central Dopamine Receptors Before and After Gastric Bypass Surgery. *Obesity Surgery* 2009; 20:369–74.
71. Dunn JP, Cowan RL, Volkow ND, Feurer ID, Li R, Williams DB, Kessler RM, Abumrad NN. Decreased dopamine type 2 receptor availability after bariatric surgery: Preliminary findings. *Brain Research* 2010; 1350:123–30.
72. Bueter M, le Roux CW. Sir David Cuthbertson Medal Lecture Bariatric surgery as a model to study appetite control. *Proceedings of Nutrition Society* 2009; 68:227.
73. Bueter M, Nocito A, Lutz TA, Schiesser M. Mechanismen des Gewichtsverlusts nach bariatrischen Operationen. *Schweizer Zeitung für Ernährungsmedizin* 2011; 29-32.
74. Abbott CR, Monteiro M, Small CJ, Sajedi A, Smith KL, Parkinson JRC, Ghatel MA, Bloom SR. The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY3–36 and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal–brainstem–hypothalamic pathway. *Brain Research* 2005; 1044:127–31.
75. Carswell KA, Vincent RP, Belgaumkar AP, Sherwood RA, Amiel SA, Patel AG, le Roux CW. The Effect of Bariatric Surgery on Intestinal Absorption and Transit Time. *Obesity Surgery* 2013; 24:796–805.
76. Rubio IGS, Galvão AL, Santo MA, Zanini AC, Medeiros-Neto G. Levothyroxine Absorption in Morbidly Obese Patients Before and After Roux-En-Y Gastric Bypass (RYGB) Surgery. *Obesity Surgery* 2011; 22:253–8.

77. Hamad GG, Helsel JC, Perel JM, Kozak GM, McShea MC, Hughes C, Confer AL, Sit DK, McCloskey CA, Wisner KL. The Effect of Gastric Bypass on the Pharmacokinetics of Serotonin Reuptake Inhibitors. *American Journal of Psychiatry* 2012; 169.
78. Seeley RJ, Chambers AP, Sandoval DA. The Role of Gut Adaptation in the Potent Effects of Multiple Bariatric Surgeries on Obesity and Diabetes. *Cell Metabolism* 2015; 21:369–78.
79. Drozdowski L, Thomson ABR. Intestinal mucosal adaptation. *World Journal of Gastroenterology* 2006; 12:4614–27.
80. Tappenden KA. Intestinal Adaptation Following Resection. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2014; 38:23S–31S.
81. Fishbein TM. Intestinal Transplantation. *New England Journal of Medicine* 2009; 361:998–1008.
82. Shaw D, Gohil K, Basson MD. Intestinal mucosal atrophy and adaptation. *World Journal of Gastroenterology* 2012; 18:6357.
83. McDuffie LA, Bucher BT, Erwin CR, Wakeman D, White FV, Warner BW. Intestinal adaptation after small bowel resection in human infants. *Journal of Pediatric Surgery* 2011; 46:1045–51.
84. Qandeel HG, Alonso F, Hernandez DJ, Madhavan S, Duenes JA, Zheng Y, Sarr MG. Peptide absorption after massive proximal small bowel resection: mechanisms of ileal adaptation. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 2011; 15:1537–47.
85. Rowland KJ, Choi PM, Warner BW. The role of growth factors in intestinal regeneration and repair in necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery* 2013; 22:101–11.
86. DiBaise JK. Short bowel syndrome and small bowel transplantation. *Current Opinion in Gastroenterology* 2014; 30:128–33.
87. Sukhotnik I, Mor-Vaknin N, Drongowski R, Miselevich I, Coran A, Harmon C. Effect of dietary fat on early morphological intestinal adaptation in a rat with short bowel syndrome. *Pediatric Surgery International* 2004; 20:419-24
88. McMellen ME, Wakeman D, Longshore SW, McDuffie LA, Warner BW. Growth factors: possible roles for clinical management of the short bowel syndrome. *YSPSU* 2010; 19:35–43.
89. Janssen P, Rotondo A, Mulé F, Tack J. Review article: a comparison of glucagon-like peptides 1 and 2. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2012; 37:18–36.

90. Swartz-Basile DA, Rubin DC, Levin MS. Vitamin A status modulates intestinal adaptation after partial small bowel resection. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 2000; 24:81–8.
91. Swartz-Basile DA, Wang L, Tang Y, Pitt HA, Rubin DC, Levin MS. Vitamin A deficiency inhibits intestinal adaptation by modulating apoptosis, proliferation, and enterocyte migration. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2003; 285:G424–32.
92. Wang L, Tang Y, Rubin DC, Levin MS. Chronically administered retinoic acid has trophic effects in the rat small intestine and promotes adaptation in a resection model of short bowel syndrome. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007; 292:G1559–69.
93. Spak E, Björklund P, Helander HF, Vieth M, Olbers T, Casselbrant A, Lönroth H, Fändriks L. Changes in the mucosa of the Roux-limb after gastric bypass surgery. *Histopathology* 2010; 57:680–8.
94. Stearns AT, Balakrishnan A, Tavakkolizadeh A. Impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on rat intestinal glucose transport. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2009; 297:G950–7.
95. le Roux CW, Borg C, Wallis K, Vincent RP, Bueter M, Goodlad R, Ghatei MA, Patel A, Bloom SR, Aylwin SJB. Gut Hypertrophy After Gastric Bypass Is Associated With Increased Glucagon-Like Peptide 2 and Intestinal Crypt Cell Proliferation. *Annals of Surgery* 2010; 252:50–6.
96. Hansen CF, Bueter M, Theis N, Lutz T, Paulsen S, Dalbøge LS, Vrang N, Jelsing J. Hypertrophy Dependent Doubling of L-Cells in Roux-en-Y Gastric Bypass Operated Rats. *PLoS ONE* 2013; 8:e65696.
97. Mumphrey MB, Patterson LM, Zheng H, Berthoud HR. Roux-en-Y gastric bypass surgery increases number but not density of CCK-, GLP-1-, 5-HT-, and neurotensin-expressing enteroendocrine cells in rats. *Neurogastroenterology & Motility* 2012; 25:e70–9.
98. Rhee NA, Wahlgren CD, Pedersen J, Mortensen B, Langholz E, Wandall EP, Friis SU, Vilmann P, Paulsen SJ, Kristiansen VB, Jelsing J, Dalboege LS, Poulsen SJ, Holst JJ, Vilsböll T, Knop FK. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on the distribution and hormone expression of small-intestinal enteroendocrine cells in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2015; 58(10):2254-8
99. Kong LC, Tap J, Aron-Wisnewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot JL, Zucker JD, Doré J, Clement K. Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. *American Journal of Clinical Nutrition* 2013; 98:16–24.

100. Osto M, Abegg K, Bueter M, le Roux CW, Cani PD, Lutz TA. Roux-en-Y gastric bypass surgery in rats alters gut microbiota profile along the intestine. *Physiology & Behavior* 2013; 119:92–6.
101. Nguyen NQ, Debreceni TL, Bambrick JE, Chia B, Deane AM, Wittert G, Rayner CK, Horowitz M, Young RL. Upregulation of intestinal glucose transporters after Roux-en-Y gastric bypass to prevent carbohydrate malabsorption. *Obesity* 2014; 22:2164–71.
102. Bhutta HY, Deelman TE, le Roux CW, Ashley SW, Rhoads DB, Tavakkoli A. Intestinal sweet-sensing pathways and metabolic changes after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology* 2014; 307:G588–93.
103. Wu Q, Li JV, Seyfried F, le Roux CW, Ashrafian H, Athanasiou T, Fenske W, Darzi A, Nicholson JK, Holmes E, Gooderham NJ. Metabolic phenotype-microRNA data fusion analysis of the systemic consequences of Roux-en-Y gastric bypass surgery. *International Journal of Obesity* 2015; 39(7):1126-34
104. Lirun K, Sewe M, Yong W. A Pilot Study: The Effect of Roux-en-Y Gastric Bypass on the Serum MicroRNAs of the Type 2 Diabetes Patient. *Obesity Surgery* 2015; 25(12):2386-92
105. Kwon IG, Ha TK, Ryu SW, Ha E. Roux-en-Y gastric bypass stimulates hypothalamic miR-122 and inhibits cardiac and hepatic miR-122 expressions. *Journal of Surgical Research* 2015; 199(2):371-7
106. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281–97.
107. Molnár A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature* 2007; 447:1126–9.
108. Zhao T, Li G, Mi S, Li S, Hannon GJ, Wang XJ, Qi Y. A complex system of small RNAs in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genes & Development* 2007; 21:1190–203.
109. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136:642–55.
110. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Publishing Group* 2010; 11:597–610.
111. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 2005; 120:15–20.
112. Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in Development and Disease. *Physiological Reviews* 2011; 91:827–87.

113. Ebert MS, Sharp PA. Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell* 2012; 149:515–24.
114. Balakrishnan A, Stearns AT, Park PJ, Dreyfuss JM, Ashley SW, Rhoads DB, Tavakkolizadeh A. Upregulation of Proapoptotic MicroRNA mir-125a After Massive Small Bowel Resection in Rats. *Annals of Surgery* 2012; 255:747–53.
115. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 2004; 23:4051–60.
116. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structure & Molecular Biology* 2006; 13:1097–101.
117. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* 2007; 36:D154–8.
118. Tanzer A, Stadler PF. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *Journal of Molecular Biology* 2004; 339:327–35.
119. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10:1957–66.
120. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425:415–9.
121. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, Yoneda Y, Tsukihara T. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 2009; 326:1275–9.
122. Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 2001; 293:1146–50.
123. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Publishing Group* 2014; 15:509–24.
124. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* 2014; 13:622–38.
125. Li M, Sun Y, Guan X, Shu X, Li C. Advanced progress on the relationship between RA and its receptors and malignant tumors. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* 2014; 91(3):271-82
126. Haenisch S, Werk AN, Cascorbi I. MicroRNAs and their relevance to ABC transporters. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2014; 77:587–96.

127. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 2009; 136:215–33.
128. Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell* 2007; 27:91–105.
129. R Core Team (2014). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
URL://www.R-project.org.
130. de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics* 2004; 20:1453–4.
131. Saldanha AJ, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Java Treeview-extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* 2004; 20:3246–8.
132. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* 2011; 6:e21800.
133. Shannon P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Research* 2003; 13:2498–504.
134. Westfall PH, Young S. Resampling-Based Multiple Testing. *Wiley-Interscience*; 1993.
135. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *Journal of Molecular Diagnostics* 2003; 5:73–81.
136. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* 2000; 25:25–9.
137. Kamburov A, Wierling C, Lehrach H, Herwig R. ConsensusPathDB-a database for integrating human functional interaction networks. *Nucleic Acids Research* 2009; 37:D623–8.
138. Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Research* 2012; 41:D793–D800.
139. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 1988; 85:8790–4.

140. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 2001; 25:402–8.
141. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)* 1995; 57:289–300.
142. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010; 50:244–9.
143. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 2008; 19:92–105.
144. Peterson SM, Thompson JA, Ufkin ML, Sathyanarayana P, Liaw L, Congdon CB. Common features of microRNA target prediction tools. *Frontiers in Genetics* 2014; 18;5:23.
145. Spearman C. The proof and measurement of association between two things. *International Journal of Epidemiology* 2010; 39:1137–50.
146. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk - Database: Prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *Journal of Biomedical Informatics* 2011; 44:839–47.
147. Garcia DM, Baek D, Shin C, Bell GW, Grimson A, Bartel DP. Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* 2011; 18:1139–46.
148. Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, Vlachos IS, Vergoulis T, Reczko M, Filippidis C, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Research* 2013; 41:W169–73.
149. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012; 28:771–6.
150. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; 265:687–95.
151. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of National Cancer Institute* 1977; 58:209–14.
152. Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986; 68:1035–40.

153. Bacher A, Griehl K, Mackamul S, Mitreiter R, Mückter H, Ben-Shaul Y. Protease Inhibitors Suppress the Formation of Tight Junctions in Gastrointestinal Cell Lines. *Experimental Cell Research* 1992; 200:97–104.
154. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72:248–54.
155. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophotonic International* 2004; 7:36-42
156. Pinto M, Robine-Leon S, Appay M-D, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Zweibaum A. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biology of the Cell* 1983; :323–30.
157. Kel AE, Größling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis OV, Wingender E. MATCHTM: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 2003; 31:3576–9.
158. Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, Reuter I, Chekmenev D, Krull M, Hornischer K, Voss N, Stegmaier P, Lewicki-Potapov B, Saxel H, Kel AE, Wingender E. TRANSFAC(R) and its module TRANSCompel(R): transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* 2006; 34:D108–10.
159. Wingender E. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Briefings in Bioinformatics* 2008; 9:326–32.
160. Martini C, Pallottini V. Cholesterol: from feeding to gene regulation. *Genes & Nutrition* 2007; 2:181–93.
161. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell* 2013; 153:654–65.
162. Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M Jr, Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. Transcriptome-wide Identification of RNA-Binding Protein and MicroRNA Target Sites by PAR-CLIP. *Cell* 2010; 141:129–41.
163. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455:58–63.

164. Lal A, Navarro F, Maher CA, Maliszewski LE, Yan N, O'Day E, Chowdhury D, Dykxhoorn DM, Tsai P, Hofmann O, Becker KG, Gorospe M, Hide W, Lieberman J. miR-24 Inhibits Cell Proliferation by Targeting E2F2, MYC, and Other Cell-Cycle Genes via Binding to "Seedless" 3'UTR MicroRNA Recognition Elements. *Molecular Cell* 2009; 35:610–25.
165. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research* 2013; 42:D199–D205.
166. Turley SD, Dietschy JM. Sterol absorption by the small intestine. *Current Opinion in Lipidology* 2003; 14:233–40.
167. Chang CC, Sakashita N, Ornvold K, Lee O, Chang ET, Dong R, Lin S, Lee CY, Strom SC, Kashyap R, Fung JJ, Farese RV, Patoiseau J-F, Delhon A, Chang TY. Immunological quantitation and localization of ACAT-1 and ACAT-2 in human liver and small intestine. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275:28083–92.
168. Xie Y, Newberry EP, Young SG, Robine S, Hamilton RL, Wong JS, Luo J, Kennedy S, Davidson NO. Compensatory increase in hepatic lipogenesis in mice with conditional intestine-specific Mttp deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:4075–86.
169. Ikonen E. Mechanisms for Cellular Cholesterol Transport: Defects and Human Disease. *Physiological Reviews* 2006; 86:1237–61.
170. Uchida A, Slipchenko MN, Eustaquio T, Leary JF, Cheng J-X, Buhman KK. Intestinal acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 2 overexpression enhances postprandial triglyceridemic response and exacerbates high fat diet-induced hepatic triacylglycerol storage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2013; 1831:1377–85.
171. Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, Goldstein JL, Brown MS. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 2002; 110:489–500.
172. Calderon-Dominguez M, Gil G, Medina MA, Pandak WM, Rodríguez-Agudo D. The StarD4 subfamily of steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer (START) domain proteins: New players in cholesterol metabolism. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2014; 49:64–8.
173. Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell* 2006; 124:35–46.
174. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research* 2014; 53:124–44.

175. Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handbook of Experimental Pharmacology* 2011; 261–83.
176. During A, Albaugh G, Smith C. Characterization of BCMO1 Activity in TC7 Clone of Human Intestinal Cell Line Caco2. *Biochemical and Biophysical research communications* 1998; 249:467-474.
177. Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, Liu Y, Klaassen CD, Brown KK, Reinhard J, Wilsin TM, Koller BH, Kliewer SA. The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 2001; 98:3369–74.
178. Ding X, Lichti K, Kim I, Gonzalez FJ, Staudinger JL. Regulation of constitutive androstane receptor and its target genes by fasting, cAMP, hepatocyte nuclear factor alpha, and the coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:26540–51.
179. Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, Haussler MR, Mangelsdorf DJ. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002; 296:1313–6.
180. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annual Review of Immunology* 2011; 29:415–45.
181. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: amicrobiota-driven disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2013; 24:537–45.
182. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *The Lancet Diabetes & Endocrinology* 2014; 3(3):207-15.
183. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, Gitto E, Arrigo T. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *International Journal of Molecular Science* 2015; 16:378–400.
184. Awada M, Soulage CO, Meynier A, Debard C, Plaisancie P, Benoit B, Picard G, Loizon E, Chauvin MA, Estienne M, Peretti N, Guichardant M, Lagarde M, Genot C, Michalski M-C. Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells. *The Journal of Lipid Research* 2012; 53:2069–80.
185. Serino M, Waget A, Marsollier N, Masseboeuf M, Payros G, Kabani C, Denom J, Lacombe A, Thiers J-C, Negre-Salvayre A, Luquet S, Burcelin R, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C. Lipid-Induced Peroxidation in the Intestine Is Involved in Glucose Homeostasis Imbalance in Mice. *PLoS ONE* 2011; 6:e21184.

186. Comelli EM, Lariani S, Zwahlen M-C, Fotopoulos G, Holzwarth JA, Cherbut C, Dorta G, Corthésy-Theulaz I, Grigorov M. Biomarkers of human gastrointestinal tract regions. *Mammalian Genome* 2009; 20:516–27.
187. de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar M, Jansen J, Müller M, van der Meer R. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Medical Genomics* 2008; 6:1-14.
188. Guo Z, Maki M, Ding R, Yang Y, zhang B, Xiong L. Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Scientific Reports* 2014; 3;4:5150.
189. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431:350–5.
190. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* 2007; 129:1401–14.
191. De Mulder K, Berezikov E. Tracing the evolution of tissue identity with microRNAs. *Genome Biology* 2010; 11:111.
192. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007; 8:166.
193. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, Brant SR, Kwon JH. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2010; 16:1729–38.
194. Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2009; 13:1227–38.
195. Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG, Delzenne NM. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut* 2009; 58:1091–103.
196. Miller GD, Nicklas BJ, Fernandez A. Serial changes in inflammatory biomarkers after Roux-en. *Surgery of Obesity and Related Diseases* 2011; 7:618–24.
197. Fenske WK, Dubb S, Bueter M, Seyfried F, Patel K, Tam FWK, Frankel AH, le Roux CW. Effect of bariatric surgery-induced weight loss on renal and systemic inflammation and blood pressure: a 12-month prospective study. *Surgery of Obesity and Related Diseases* 2013; 9:559–68.

198. Choi SC, Savage DB, Kulkari A, Yu XX, Liu Z-X. Suppression of Diacylglycerol Acyltransferase-2 (DGAT2), but Not DGAT1, with Antisense Oligonucleotides Reverses Diet-induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:22678–88.
199. McFarlane MR, Liang G, Engelking LJ. Insig Proteins Mediate Feedback Inhibition of Cholesterol Synthesis in the Intestine. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289:2148–56.
200. Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, Goldstein JL. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proceeding of the National Academy of Science USA* 2003; 100:12027–32.
201. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal Drug Transporters: An Overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2013; 65:1340–56.
202. Fisher MB, Labissiere G. The role of the intestine in drug metabolism and pharmacokinetics: an industry perspective. *Current Drug Metabolism* 2007; 8:694-9.
203. Duane WC, Xiong W, Wolvers J. Effects of bile acids on expression of the human apical sodium dependent bile acid transporter gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2007; 1771:1380–8.
204. Lietz G, Lange J, Rimbach G. Molecular and dietary regulation of β , β -carotene 15,15-monooxygenase 1 (BCMO1). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2010; 502:8–16.
205. Runtsch MC, Round JL, O'Connell RM. MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. *Frontiers in Genetics* 2014; 5:347.
206. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nature Review Drug Discovery* 2008; 7:678–93.
207. Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA. Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 2013; 304:H1060–76.
208. Jeoung NH. Pyruvate Dehydrogenase Kinases: Therapeutic Targets for Diabetes and Cancers. *Diabetes & Metabolism Journal* 2015; 39:188.
209. Barres R, Kirchner H, Rasmussen M, Yan J, Kantor FR, Krook A, Näslund E, Zierath JR. Weight Loss after Gastric Bypass Surgery in Human Obesity Remodels Promoter Methylation. *Cell Reports* 2013; 3:1020–7.

-
210. Elliott RL, Elliott MC, Wang F, Head JF. Breast carcinoma and the role of iron metabolism. A cytochemical, tissue culture, and ultrastructural study. *Annals of New York Academy of Sciences* 1993; 698:159–66.
211. Pilichiewicz AN, Little TJ, Brennan IM, Meyer JH, Wishart JM, Otto B, Horowitz M, Feinle-Bisset C. Effects of load, and duration, of duodenal lipid on antropyloroduodenal motility, plasma CCK and PYY, and energy intake in healthy men. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2005; 290:R668–77.
212. Gunawardene AR, Corfe BM, Staton CA. Classification and functions of enteroendocrine cells of the lower gastrointestinal tract. *International Journal of Experimental Pathology* 2011; 92:219–31.
213. Okabe Y, Medzhitov R. Tissue-Specific Signals Control Reversible Program of Localization and Functional Polarization of Macrophages. *Cell* 2014; 157:832–44.
214. Lobo GP, Amengual J, Li HNM, Golczak M, Bonet ML, Palczewski K, Lintig Von J. β , β -Carotene Decreases Peroxisome Proliferator Receptor Activity and Reduces Lipid Storage Capacity of Adipocytes in a β , β -Carotene Oxygenase 1-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285:27891–9.
215. Amengual J, Gouranton E, Van Helden YGJ, Hessel S, Ribot J, Kramer E, Kiec-Wilk B, Razny U, Lietz G, Wyss A, et al. Beta-Carotene Reduces Body Adiposity of Mice via BCMO1. *PLoS ONE* 2011; 6:e20644.
216. Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, Elste V, Hunziker W, Goralczyk R, Oberhauser V, et al. CMO1 Deficiency Abolishes Vitamin A Production from beta-Carotene and Alters Lipid Metabolism in Mice. *Journal of Biological Chemistry* 2007; 282:33553–61.
217. Calkin AC, Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. *Nature Publishing Group* 2012; 13:213–24.

Anhang

Tabelle 1 Darstellung der 29 differenziell exprimierten mRNAs (27 heraufreguliert und 2 herunterreguliert) zwischen Jejunum und Duodenum vor RYGB basierend auf den Transkriptomdaten der Affymetrix Microarrays bezogen auf das Duodenum

Jejunum vs. Duodenum			
Gen-symbol ^a	Genname ^b	<i>fold change</i> ^c	FDR [%] ^d
heraufreguliert			
<i>RGS1</i>	<i>regulator of G-protein signaling 1</i>	3,16	0,11
<i>FKBP5</i>	<i>FK506 binding protein 5</i>	3,02	0,03
<i>SGK1</i>	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase 1</i>	2,99	0,01
<i>MFAP5</i>	<i>microfibrillar associated protein 5</i>	2,77	0,17
<i>MFSD2</i>	<i>major facilitator superfamily domain containing 2</i>	2,59	0,01
<i>TLL1</i>	<i>tolloid-like 1</i>	2,11	0,08
<i>DUSP1</i>	<i>dual specificity phosphatase 1</i>	2,06	0,01
<i>LPGAT1</i>	<i>lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1</i>	1,99	0,15
<i>CTPS</i>	<i>CTP synthase</i>	1,93	0,00
<i>PCK1</i>	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (soluble)</i>	1,85	0,74
<i>KLRC3</i>	<i>killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 3</i>	1,84	0,19
<i>SDR16C5</i>	<i>short chain dehydrogenase/reductase family 16C, member 5</i>	1,82	0,02
<i>PMP22</i>	<i>peripheral myelin protein 22</i>	1,79	0,26
<i>FAM134B</i>	<i>family with sequence similarity 134, member B</i>	1,79	0,56
<i>EMP1</i>	<i>epithelial membrane protein 1</i>	1,73	0,46
<i>NFKBIA</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i>	1,70	0,08
<i>TIPARP</i>	<i>TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase</i>	1,63	0,06
<i>PIM1</i>	<i>pim-1 oncogene</i>	1,61	0,04
<i>DUSP6</i>	<i>dual specificity phosphatase 6</i>	1,61	0,18
<i>FOS</i>	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>	1,60	0,73
<i>CD69</i>	<i>CD69 molecule</i>	1,60	0,20
<i>VIP</i>	<i>vasoactive intestinal peptide</i>	1,59	0,90
<i>PELI1</i>	<i>pellinoE3 ubiquitin protein ligase 1</i>	1,56	0,00
<i>CCDC146</i>	<i>coiled-coil domain containing 146</i>	1,54	0,79
<i>RB1CC1</i>	<i>RB1-inducible coiled-coil 1</i>	1,53	0,34
<i>HBB</i>	<i>hemoglobin, beta</i>	1,52	2,65
<i>TMCC3</i>	<i>transmembrane and coiled-coil domain family 3</i>	1,52	0,07
herunterreguliert			
<i>AMBP</i>	<i>alpha-1-microglobulin/bikunin precursor</i>	-1,50	0,11
<i>ADA</i>	<i>adenosine deaminase</i>	-3,11	0,17

^aoffizielle Gensymbole, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^boffizielle Gennamen, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^c*fold change*: basierend auf der Ratio der beiden Mediane von Jejunum vs. Duodenum

^d*false discovery rate* (FDR): berechnet für den *fold change* jedes einzelnen Gens unter Verwendung einer Westfall und Young Permutation (k = 10000 Permutationen)

Tabelle 2 Darstellung der 86 differenziell exprimierten mRNAs (68 heraufreguliert und 18 herunterreguliert) zwischen Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB und Duodenum vor RYGB basierend auf den Transkriptomdaten der Affymetix Microarrays bezogen auf das Duodenum

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
Gen-symbol ^a	Genname ^b	fold change ^c	FDR [%] ^d
heraufreguliert			
KCNJ13	potassium channel, inwardly-rectifying subfamily J, member 13	5,04	1,43
BCMO1	beta-carotene oxygenase 1	4,84	0,00
INSIG1	insulin induced gene 1	4,17	0,01
NTS	neurotensin	4,08	0,04
SCD	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	3,97	0,01
CUBN	cubilin	3,72	0,24
FMO1	flavin containing monooxygenase 1	3,71	0,01
ALDOC	aldolase, fructose-bisphosphate C	3,50	0,00
CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	2,78	0,03
CPO	carboxypeptidase O	2,70	0,06
NAALADL1	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1	2,59	0,70
SC4MOL	sterol-C4-methyl oxidase-like	2,54	1,23
TSPAN1	tetraspanin 1	2,36	0,06
PMP22	peripheral myelin protein 22	2,35	0,06
IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	2,33	0,39
B4GALNT2	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 2	2,29	0,26
OCC-1	overexpressed in colon carcinoma-1	2,28	0,28
SC5DL	sterol-C5-desaturase	2,18	1,04
GUCA2A	guanylate cyclase activator 2A (guanylin)	2,17	0,68
C15orf48	chromosome 15 open reading frame 48	2,17	0,13
SDR16C5	short chain dehydrogenase/reductase family 16C, member 5	2,13	0,06
SLC5A4	solute carrier family 5 (low affinity glucose cotransporter), member 4	2,13	0,58
DEFB131	defensin, beta 131	2,11	0,02
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	2,07	0,14
CEACAM20	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 20	2,05	0,07
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	2,03	1,01
LDLR	low density lipoprotein receptor	2,02	0,60
FLJ38359	hypothetical protein FLJ38359	1,99	2,64
GAS2L3	growth arrest-specific 2 like 3	1,91	0,74
PIK3C2G	phosphoinositide-3-kinase, class 2, gamma polypeptide	1,89	0,38
DPEP1	dipeptidase 1 (renal)	1,88	0,53
SOD1	superoxide dismutase 1, soluble	1,86	0,06
EBP	emopamil binding protein (sterol isomerase)	1,86	0,15
NAAA	N-acylethanolamine acid amidase	1,84	0,96
SHBG	sex hormone-binding globulin	1,84	0,10
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	1,83	2,93
ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	1,80	0,67
RDH11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)	1,80	0,05
C14orf1	chromosome 14 open reading frame 1	1,78	0,93
SLC30A4	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4	1,75	0,12

<i>NPC1L1</i>	<i>NPC1 (Niemann-Pick disease, type C1, gene)-like 1</i>	1,74	0,12
<i>ABCG8</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8</i>	1,73	4,28
<i>NAT8B</i>	<i>N-acetyltransferase 8B (GCN5-related, putative, gene/pseudogene)</i>	1,70	1,14
<i>LGALS2</i>	<i>lectin, galactoside-binding, soluble, 2</i>	1,68	0,92
<i>TINAG</i>	<i>tubulointerstitial nephritis antigen</i>	1,67	0,97
<i>SLC23A1</i>	<i>solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 1</i>	1,67	0,80
<i>SLC14A2</i>	<i>solute carrier family 14 (urea transporter), member 2</i>	1,66	0,09
<i>SREBF2</i>	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 2</i>	1,64	0,12
<i>GK</i>	<i>glycerol kinase</i>	1,63	0,50
<i>NSDHL</i>	<i>NAD(P) dependent steroid dehydrogenase-like</i>	1,62	0,32
<i>ANTXR2</i>	<i>anthrax toxin receptor 2</i>	1,58	3,36
<i>LRAT</i>	<i>lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine--retinol O-acyltransferase)</i>	1,57	0,15
<i>MGAT4A</i>	<i>mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A</i>	1,56	0,47
<i>QPRT</i>	<i>quinolinate phosphoribosyltransferase</i>	1,56	0,11
<i>SWAP70</i>	<i>SWAP-70 protein</i>	1,55	0,37
<i>GRINA</i>	<i>glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (glutamate binding)</i>	1,54	0,02
<i>NAG</i>	<i>neuroblastoma-amplified protein</i>	1,54	0,63
<i>CRIP1</i>	<i>cysteine-rich protein 1 (intestinal)</i>	1,53	0,16
<i>SATB2</i>	<i>SATB homeobox 2</i>	1,53	0,05
<i>STARD4</i>	<i>StAR-related lipid transfer domain containing 4</i>	1,52	2,15
<i>HNF4G</i>	<i>hepatocyte nuclear factor 4, gamma</i>	1,52	0,43
<i>SLC6A8</i>	<i>solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8</i>	1,51	0,22
<i>ATP6V1B2</i>	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B2</i>	1,51	0,39
<i>PLS1</i>	<i>plastin 1 (I isoform)</i>	1,51	0,48
<i>ARHGDI3</i>	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma</i>	1,51	0,22
<i>RALYL</i>	<i>RALY RNA binding protein-like</i>	1,51	0,24
<i>PNPLA3</i>	<i>patatin-like phospholipase domain containing 3</i>	1,50	1,70
<i>SLC5A11</i>	<i>solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11</i>	1,50	0,39
herunterreguliert			
<i>PDE10A</i>	<i>phosphodiesterase 10A</i>	-1,51	0,02
<i>DGAT2</i>	<i>diacylglycerol O-acyltransferase homolog 2 (mouse)</i>	-1,53	0,02
<i>APOA1</i>	<i>apolipoprotein A-I</i>	-1,55	0,00
<i>TMEM86B</i>	<i>transmembrane protein 86B</i>	-1,71	0,00
<i>SLC46A1</i>	<i>solute carrier family 46 (folate transporter), member 1</i>	-1,77	0,22
<i>SLC22A17</i>	<i>solute carrier family 22, member 17</i>	-1,79	0,03
<i>ISX</i>	<i>intestine-specific homeobox</i>	-1,83	0,05
<i>SCNN1A</i>	<i>sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha</i>	-1,91	0,03
<i>MEIS2</i>	<i>Meis homeobox 2</i>	-1,93	0,01
<i>SCN3B</i>	<i>sodium channel, voltage-gated, type III, beta</i>	-2,00	0,00
<i>RHOBTB1</i>	<i>Rho-related BTB domain containing 1</i>	-2,01	0,00
<i>PRSS7</i>	<i>protease, serine, 7 (enterokinase)</i>	-2,08	0,02
<i>RP5-1022P6.2</i>	<i>hypothetical protein KIAA1434</i>	-2,37	0,00

TRPV6	<i>transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6</i>	-2,38	0,00
GRAMD1B	<i>GRAM domain containing 1B</i>	-2,57	0,01
S100G	<i>S100 calcium binding protein G</i>	-2,99	0,00
SLC10A2	<i>solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2</i>	-4,16	0,00
ADA	<i>adenosine deaminase</i>	-5,74	0,00

^aoffizielle Gensymbole, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^boffizielle Gennamen, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^c*fold change*: basierend auf der Ratio der beiden Mediane von Roux-Schenkel vs. Duodenum

^d*false discovery rate* (FDR): berechnet für den *fold change* jedes einzelnen Gens unter Verwendung einer Westfall und Young Permutation (k = 10000 Permutationen)

Tabelle 3 Darstellung der 68 differenziell exprimierten mRNAs (24 heraufreguliert und 44 herunterreguliert) zwischen Roux-Schenkel ein Jahr nach RYGB und Jejunum vor RYGB basierend auf den Transkriptomdaten der Affymetix Microarrays bezogen auf das Jejunum

Roux-Schenkel vs. Jejunum			
Gen-symbol ^a	Genname ^b	<i>fold change</i> ^c	FDR [%] ^d
heraufreguliert			
INSIG1	<i>insulin induced gene 1</i>	3,78	0,04
CUBN	<i>cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)</i>	3,04	0,03
SCD	<i>stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)</i>	2,85	0,87
ALDOC	<i>aldolase C, fructose-bisphosphate</i>	2,71	0,12
BCMO1	<i>beta-carotene oxygenase 1</i>	2,65	0,41
SC4MOL	<i>sterol-C4-methyl oxidase-like</i>	2,58	0,11
DHCR24	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>	2,46	0,77
CPO	<i>carboxypeptidase O</i>	2,28	0,42
CYP51A1	<i>cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1</i>	2,16	0,25
TNFSF15	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 15</i>	1,99	0,17
NAALADL1	<i>N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase-like 1</i>	1,97	0,76
CEACAM20	<i>carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 20</i>	1,93	0,01
C14orf1	<i>chromosome 14 open reading frame 1</i>	1,90	0,52
NAT8	<i>N-acetyltransferase 8 (GCN5-related, putative)</i>	1,84	1,25
PNPLA3	<i>patatin-like phospholipase domain containing 3</i>	1,73	0,09
ARHGDI3	<i>Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma</i>	1,62	0,12
RALYL	<i>RALY RNA binding protein-like</i>	1,60	0,17
FLJ38359	<i>hypothetical protein FLJ38359</i>	1,60	0,93
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)</i>	1,59	0,39
STARD4	<i>StAR-related lipid transfer domain containing 4</i>	1,59	0,47
NAAA	<i>N-acylethanolamine acid amidase</i>	1,57	0,12
NFKBIZ	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>	1,55	0,57
RDH11	<i>retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)</i>	1,53	0,47
GABRB2	<i>gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2</i>	1,53	0,04
herunterreguliert			
TREH	<i>trehalase (brush-border membrane glycoprotein)</i>	-1,51	0,00
LTBP1	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	-1,52	0,00

ENPP7	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 7	-1,52	0,10
PELI1	pellino homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	-1,53	0,00
HERC4	hect domain and RLD 4	-1,54	0,00
CD69	CD69 molecule	-1,55	0,04
PAQR7	progesterin and adipoQ receptor family member VII	-1,56	0,01
PLA2G4C	phospholipase A2, group IVC (cytosolic, calcium-independent)	-1,57	0,01
CTPS	CTP synthase	-1,58	0,12
APOC2	apolipoprotein C-II	-1,58	0,02
CIDEC	cell death-inducing DFFA-like effector c	-1,61	0,03
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	-1,61	0,01
IL18	interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	-1,61	0,00
ALPI	alkaline phosphatase, intestinal	-1,61	0,04
RGN	regucalcin (senescence marker protein-30)	-1,63	0,00
APOA1	apolipoprotein A-I	-1,65	0,00
JUN	jun oncogene	-1,65	0,00
PER1	period homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	-1,66	0,04
LITAF	lipopolysaccharide-induced TNF factor	-1,69	0,00
NR0B2	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 2	-1,69	0,07
SLC46A1	solute carrier family 46 (folate transporter), member 1	-1,76	0,00
TM4SF4	transmembrane 4 L six family member 4	-1,78	0,01
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	-1,83	0,00
RP5-1022P6.2	hypothetical protein KIAA1434	-1,83	0,01
SSX2IP	synovial sarcoma, X breakpoint 2 interacting protein	-1,85	0,00
SLC22A17	solute carrier family 22, member 17	-1,88	0,00
RHOBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	-1,89	0,00
ERRFI1	ERBB receptor feedback inhibitor 1	-1,90	0,00
PPYR1	pancreatic polypeptide receptor 1	-1,95	0,13
ADFP	adipose differentiation-related protein	-1,99	0,00
SLC10A2	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2	-2,00	0,00
TNFRSF21	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21	-2,06	0,00
MFAP5	microfibrillar associated protein 5	-2,23	0,07
ANXA13	annexin A13	-2,27	0,01
SCNN1A	sodium channel, nonvoltage-gated 1 alpha	-2,28	0,01
THBS1	thrombospondin 1	-2,42	0,01
GRAMD1B	GRAM domain containing 1B	-2,43	0,00
RAB30	RAB30, member RAS oncogene family	-2,44	0,00
HBA1	hemoglobin, alpha 1	-2,57	0,02
SGK1	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-2,71	0,00
HBB	hemoglobin, beta	-2,82	0,00
TLL1	tolloid-like 1	-3,01	0,00
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	-4,21	0,01
HMGCS2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	-5,57	0,00

^aoffizielle Gensymbole, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^boffizielle Gennamen, die vom HUGO Gene Nomenclature Committee zugelassen sind

^cfold change: basierend auf der Ratio der beiden Mediane von Roux-Schenkel vs. Jejunum

^dfalse discovery rate (FDR): berechnet für den fold change jedes einzelnen Gens unter Verwendung einer Westfall und Young Permutation (k = 10000 Permutationen)

Tabelle 4 Darstellung der 129 differenziell exprimierten microRNAs (123 heraufreguliert und 6 herunterreguliert) im Vergleich Jejunum vs. Duodenum vor RYGB (linke Spalte) und der 111 differenziell exprimierten microRNAs (3 heraufreguliert und 108 herunterreguliert) im Vergleich Roux-Schenkel vs. Jejunum (rechte Spalte) basierend auf den microRNA *screening* Daten

Jejunum vs. Duodenum			Roux-Schenkel vs. Jejunum		
microRNA	<i>fold change</i> ^a	p-Wert ^b	microRNA	<i>fold change</i> ^a	p-Wert ^b
heraufreguliert			heraufreguliert		
hsa-miR-144	6,65	0,041	hsa-miR-302b	2,30	0,025
hsa-miR-379	4,87	0,041	hsa-miR-302c	2,20	0,020
hsa-miR-486-5p	4,43	0,041	hsa-miR-202	1,57	0,029
hsa-miR-539	3,92	0,041	herunterreguliert		
hsa-miR-144-5p	3,52	0,041	hsa-miR-146a	-1,23	0,025
hsa-miR-451	3,38	0,041	hsa-miR-301a	-1,24	0,042
hsa-miR-137	3,37	0,041	hsa-miR-132	-1,26	0,020
hsa-miR-365	3,30	0,041	hsa-miR-374a	-1,27	0,029
hsa-miR-99a	3,25	0,041	hsa-miR-150	-1,32	0,036
hsa-miR-15a	3,21	0,041	hsa-miR-103	-1,32	0,036
hsa-miR-708	3,13	0,041	hsa-miR-331-3p	-1,33	0,025
hsa-miR-485-5p	3,03	0,044	hsa-miR-195	-1,34	0,020
hsa-miR-26a-1-3p	3,01	0,041	hsa-miR-324-3p	-1,35	0,042
hsa-miR-27a-5p	2,97	0,041	hsa-miR-212	-1,35	0,025
hsa-miR-133a	2,89	0,041	hsa-miR-511	-1,35	0,020
hsa-miR-432	2,83	0,044	hsa-miR-199a-3p	-1,37	0,036
hsa-miR-138	2,83	0,041	hsa-miR-24	-1,39	0,042
hsa-miR-10b-3p	2,59	0,041	hsa-miR-148b-5p	-1,41	0,025
hsa-miR-99b-3p	2,36	0,041	hsa-miR-193a-5p	-1,41	0,025
hsa-miR-149	2,36	0,041	hsa-miR-328	-1,42	0,029
hsa-miR-320	2,30	0,041	hsa-miR-374b	-1,42	0,029
hsa-miR-489	2,29	0,041	hsa-miR-340	-1,43	0,042
hsa-miR-383	2,26	0,048	hsa-miR-127-3p	-1,44	0,023
hsa-miR-454	2,21	0,041	hsa-miR-598	-1,44	0,029
hsa-miR-410	2,11	0,044	hsa-miR-197	-1,46	0,042
hsa-miR-10b	2,09	0,041	hsa-miR-1179	-1,47	0,021
hsa-miR-1271	2,10	0,044	hsa-miR-191	-1,49	0,042
hsa-miR-487b	2,07	0,041	hsa-miR-125b	-1,49	0,029
hsa-miR-409-3p	2,08	0,041	hsa-miR-139-5p	-1,50	0,021
hsa-miR-186	2,08	0,041	hsa-miR-769-5p	-1,51	0,029
hsa-miR-574-3p	2,05	0,041	hsa-miR-30a-5p	-1,53	0,029
hsa-miR-27b-5p	2,05	0,041	hsa-miR-145	-1,53	0,019
hsa-miR-491-5p	2,03	0,044	hsa-miR-411	-1,54	0,029
hsa-miR-184	2,03	0,048	hsa-miR-181a-2-3p	-1,54	0,025
hsa-let-7f	2,00	0,048	hsa-miR-10a	-1,55	0,020
hsa-miR-370	1,99	0,041	hsa-miR-590-3p	-1,55	0,042
hsa-miR-339-3p	1,93	0,048	hsa-miR-185	-1,55	0,025
hsa-miR-454-5p	1,93	0,041	hsa-miR-146b-5p	-1,56	0,035
hsa-miR-9-3p	1,92	0,044	hsa-miR-497	-1,57	0,042

hsa-miR-337-5p	1,88	0,044
hsa-miR-199a-5p	1,87	0,041
hsa-miR-34a-3p	1,87	0,041
hsa-miR-10a-3p	1,85	0,041
hsa-miR-143	1,82	0,041
hsa-miR-101	1,81	0,041
hsa-miR-376c	1,77	0,041
hsa-miR-214-5p	1,77	0,041
hsa-miR-197	1,76	0,044
hsa-miR-1	1,76	0,039
hsa-miR-16	1,74	0,041
hsa-miR-30a-3p	1,74	0,041
hsa-miR-93-3p	1,74	0,041
hsa-miR-590-5p	1,73	0,041
hsa-miR-628-3p	1,73	0,041
hsa-miR-1201	1,73	0,048
hsa-miR-362-3p	1,72	0,048
hsa-miR-340-3p	1,71	0,041
hsa-miR-136-3p	1,71	0,041
hsa-miR-20b	1,69	0,041
hsa-miR-140-5p	1,68	0,041
hsa-miR-345	1,67	0,041
hsa-miR-125a-5p	1,67	0,042
hsa-miR-590-3p	1,64	0,041
hsa-miR-411	1,63	0,048
hsa-miR-210	1,61	0,044
hsa-miR-15a-3p	1,59	0,041
hsa-miR-140-3p	1,59	0,041
hsa-miR-744-3p	1,58	0,041
hsa-miR-100	1,56	0,048
hsa-miR-26b-3p	1,55	0,044
hsa-miR-145-3p	1,54	0,041
hsa-miR-374a	1,54	0,041
hsa-miR-145	1,53	0,041
hsa-miR-218	1,53	0,041
hsa-miR-500	1,53	0,041
hsa-miR-545-5p	1,53	0,041
hsa-miR-183	1,51	0,044
hsa-miR-193a-5p	1,51	0,041
hsa-miR-21-5p	1,49	0,048
hsa-miR-30e-3p	1,47	0,041
hsa-miR-222	1,47	0,041
hsa-let-7g	1,47	0,041
hsa-miR-494	1,47	0,048
hsa-miR-331-3p	1,47	0,048
hsa-miR-17-3p	1,47	0,044
rno-miR-7-1-3p	1,47	0,041
hsa-miR-191	1,47	0,044

hsa-miR-484	-1,57	0,042
hsa-miR-126	-1,57	0,021
hsa-miR-214	-1,61	0,021
hsa-miR-27a	-1,61	0,042
hsa-miR-145-3p	-1,62	0,025
hsa-miR-152	-1,63	0,025
hsa-miR-342-3p	-1,63	0,036
hsa-miR-592	-1,66	0,036
hsa-miR-29a	-1,66	0,025
hsa-miR-455-5p	-1,67	0,021
hsa-miR-140-3p	-1,68	0,042
hsa-miR-223	-1,68	0,020
hsa-miR-140-5p	-1,71	0,023
hsa-miR-223-5p	-1,71	0,023
hsa-miR-125a-5p	-1,74	0,023
hsa-miR-491-5p	-1,74	0,042
hsa-miR-30e-3p	-1,77	0,036
hsa-miR-100	-1,80	0,023
hsa-miR-376c	-1,80	0,020
hsa-miR-545	-1,81	0,042
hsa-miR-590-5p	-1,82	0,042
hsa-miR-101	-1,83	0,042
hsa-miR-628-3p	-1,84	0,025
hsa-miR-409-3p	-1,84	0,035
hsa-miR-218	-1,88	0,029
hsa-miR-487b	-1,86	0,029
hsa-miR-574-3p	-1,89	0,025
hsa-miR-136-3p	-1,90	0,025
hsa-miR-16	-1,92	0,029
hsa-miR-655	-1,92	0,020
hsa-miR-361-5p	-1,92	0,021
hsa-miR-222	-1,96	0,020
hsa-miR-10b	-1,96	0,025
hsa-miR-500	-2,03	0,025
hsa-miR-130a	-2,06	0,021
hsa-miR-27b-5p	-2,06	0,036
rno-miR-29c-5p	-2,07	0,036
hsa-miR-214-5p	-2,07	0,021
hsa-miR-424	-2,07	0,023
hsa-miR-186	-2,08	0,029
hsa-miR-143	-2,14	0,036
hsa-miR-30a-3p	-2,15	0,021
hsa-miR-34b	-2,16	0,023
hsa-miR-454-5p	-2,17	0,029
hsa-miR-9-3p	-2,18	0,023
hsa-miR-337-5p	-2,22	0,042
hsa-miR-21-3p	-2,23	0,021
hsa-miR-320	-2,30	0,025

hsa-miR-125b	1,47	0,041
hsa-miR-497	1,46	0,041
hsa-miR-655	1,45	0,048
hsa-miR-17	1,45	0,048
hsa-miR-342-3p	1,44	0,044
hsa-miR-374b	1,43	0,041
hsa-let-7e	1,43	0,048
hsa-miR-30b	1,42	0,048
hsa-miR-126	1,42	0,044
hsa-miR-139-5p	1,41	0,044
hsa-miR-340	1,41	0,044
hsa-miR-542-3p	1,41	0,048
hsa-miR-106a	1,39	0,048
hsa-miR-128	1,36	0,048
hsa-miR-148b-5p	1,36	0,041
hsa-miR-30a-5p	1,34	0,041
hsa-miR-212	1,34	0,041
hsa-miR-324-3p	1,32	0,048
hsa-miR-126-5p	1,32	0,041
hsa-miR-152	1,32	0,048
hsa-miR-301a	1,31	0,044
hsa-miR-598	1,31	0,044
hsa-miR-378a-3p	1,31	0,044
hsa-miR-181a-2-3p	1,30	0,048
hsa-miR-214	1,30	0,044
hsa-miR-769-5p	1,30	0,041
hsa-miR-24	1,29	0,041
hsa-miR-199a-3p	1,29	0,041
hsa-miR-335	1,24	0,048
hsa-miR-422a	1,21	0,048
hsa-miR-19a	1,19	0,048
hsa-miR-29a-5p	1,18	0,044
hsa-miR-30d	1,16	0,044
hsa-miR-151-5p	1,14	0,044
hsa-miR-19b	1,13	0,041
hsa-miR-195	1,08	0,048
herunterreguliert		
hsa-miR-1300	-1,45	0,041
hsa-miR-618	-1,85	0,041
hsa-miR-302c	-1,86	0,041
hsa-miR-672	-2,04	0,048
hsa-miR-202	-2,11	0,041
hsa-miR-1290	-3,32	0,041

hsa-miR-339-3p	-2,32	0,023
hsa-miR-1271	-2,34	0,025
hsa-miR-451	-2,34	0,020
hsa-miR-454	-2,38	0,023
hsa-miR-410	-2,49	0,020
hsa-miR-149	-2,50	0,021
hsa-miR-34c-5p	-2,53	0,029
hsa-miR-99a	-2,54	0,020
hsa-miR-199a-5p	-2,56	0,025
hsa-miR-10a-3p	-2,58	0,020
hsa-miR-874	-2,58	0,020
hsa-miR-144-5p	-2,66	0,025
hsa-miR-10b-3p	-2,89	0,025
hsa-miR-137	-3,04	0,020
hsa-miR-26a-1-3p	-3,16	0,029
hsa-miR-139-3p	-3,20	0,023
hsa-miR-486-5p	-3,30	0,020
hsa-miR-370	-3,39	0,025
hsa-miR-133a	-3,39	0,021
hsa-miR-138	-3,39	0,021
hsa-miR-15a	-4,28	0,042
hsa-miR-323-3p	-4,47	0,020
hsa-miR-539	-4,74	0,025
hsa-miR-379	-5,07	0,021
hsa-miR-144	-6,16	0,023

^a*fold change*: basiert auf der Ratio der beiden Mediane von (linke Spalte) Jejunum vs. Duodenum und (rechte Spalte) Roux-Schenkel vs. Jejunum

^bBenjamini-Hochberg korrigierter p-Wert

Tabelle 5 Darstellung der überrepräsentierten *Gene Ontology* Terme, sowie der jeweils assoziierten Gene des Vergleichs Jejunum vs. Duodenum

Jejunum vs. Duodenum			
GO-ID^a	Termname	q-Wert^b	zugeordnete Gene
GO:0014070	response to organic cyclic compound	0,00205	ADA; DUSP1; DUSP6; FOS; NFKBIA; PELI1; TIPARP
GO:0000302	response to reactive oxygen species	0,00205	ADA; DUSP1; FOS; HBB
GO:0060405	regulation of penile erection	0,00205	ADA; VIP
GO:0010941	regulation of cell death	0,00205	ADA; DUSP1; DUSP6; HBB; NFKBIA; PIM1; RB1CC1; SGK1; VIP
GO:0002758	innate immune response-activating signal transduction	0,00287	DUSP6; FOS; NFKBIA; PELI1;
GO:0023057	negative regulation of signaling	0,00478	ADA; AMBP; DUSP1; DUSP6; NFKBIA; RB1CC1; RGS1
GO:0031098	stress-activated protein kinase signaling cascade	0,00575	AMBP; DUSP6; FOS; RB1CC1;
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	0,00575	ADA; DUSP1; HBB
GO:0048585	negative regulation of response to stimulus	0,00713	ADA; AMBP; DUSP1; DUSP6; NFKBIA; RB1CC1; RGS1
GO:0002764	immune response-regulating signaling pathway	0,00726	ADA; DUSP6; FOS; NFKBIA; PELI1
GO:0050776	regulation of immune response	0,00817	ADA; AMBP; DUSP6; FOS; NFKBIA; PELI1
GO:0043433	negative regulation of sequence-specific DNA binding transcription factor activity	0,00817	NFKBIA; PELI1; PIM1
GO:0000165	MAPK cascade	0,01480	AMBP; DUSP1; DUSP6; FOS; RB1CC1;
GO:0080134	regulation of response to stress	0,01585	ADA; AMBP; DUSP6; FOS; NFKBIA; PELI1;
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	0,01661	ADA; AMBP; DUSP1; DUSP6; FOS; LPGAT1; PCK1; PIM1; RB1CC1; RGS1; SGK1; VIP
GO:0012501	programmed cell death	0,01743	ADA; DUSP1; DUSP6; NFKBIA; PIM1; RB1CC1; SGK1; VIP
GO:0003013	circulatory system process	0,01743	ADA; HBB; SGK1; VIP
GO:0007611	learning or memory	0,01748	FOS ; SGK1; VIP
GO:0043412	macromolecule modification	0,01748	AMBP; DUSP1; DUSP6; FKBP5; FOS; PCK1; PELI1; PIM1; RB1CC1; SGK1; TIPARP
GO:0002684	positive regulation of immune system process	0,01842	ADA; DUSP6; FOS; NFKBIA; PELI1
GO:0043331	response to dsRNA	0,02075	NFKBIA; PELI1
GO:0002683	negative regulation of immune system process	0,02075	ADA; AMBP; PELI1
GO:0009966	regulation of signal transduction	0,02075	ADA; AMBP; DUSP1; DUSP6; NFKBIA; PELI1; RB1CC1; RGS1;

			VIP
GO:0048523	negative regulation of cellular process	0,02075	ADA; AMBP; DUSP1; DUSP6; NFKBIA; PELI1; PIM1; PMP22; RB1CC1; RGS1; VIP;
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	0,02579	FOS; NFKBIA; PELI1
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin	0,02939	FOS; NFKBIA; PELI1
GO:0036211	protein modification process	0,03121	AMBP; DUSP1; DUSP6; FKBP5; PCK1; PELI1; PIM1; RB1CC1; SGK1; TIPARP
GO:0003014	renal system process	0,03121	HBB; SGK1

^a ID = Identifikator

^b entspricht dem mittels FDR Methode korrigiertem p-Wert

Tabelle 6 Darstellung der überrepräsentierten *Gene Ontology* Terme, sowie der jeweils assoziierten Gene des Vergleichs Roux-Schenkel vs. Duodenum

Roux-Schenkel vs. Duodenum			
GO-ID ^a	Termname	q-Wert ^b	zugeordnete Gene
GO:0008202	steroid metabolic process	1,33*10 ⁻¹¹	APOA1; CUBN; CYP51A1; CYP7A1; DHCR7; DHCR24; EBP; HMGCR; IDI1; INSIG1; LDLR; NPC1L1; NSDHL; SLC10A2; SOD1; SREBF2
GO:0006066	alcohol metabolic process	1,69*10 ⁻¹¹	APOA1; CUBN; CYP51A1; CYP7A1; DGAT2; DHCR7; DHCR24; EBP; GK; HMGCR; IDI1; INSIG1; LDLR; NPC1L1; NSDHL; SOD1; SREBF2
GO:0008610	lipid biosynthetic process	2,71*10 ⁻¹⁰	APOA1; BCMO1; CYP51A1; CYP7A1; DGAT2; DHCR7; DHCR24; EBP; GK; HMGCR; IDI1; INSIG1; LDLR; NPC1L1; NSDHL; PIK3C2G; PNPLA3; SCD; SOD1
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	4,08*10 ⁻⁰⁹	APOA1; BCMO1; DGAT2; HMGCR; IDI1; ISX; LDLR; LRAT; RDH11; SDR16C5
GO:1901617	organic hydroxy compound biosynthetic process	1,75*10 ⁻⁰⁸	APOA1; CYP51A1; DHCR7; DHCR24; EBP; HMGCR; IDI1; INSIG1; NPC1L1; NSDHL; SOD1
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	3,44*10 ⁻⁰⁷	APOA1; BCMO1; CYP51A1; CYP7A1; DHCR7; DHCR24; EBP; HMGCR; IDI1; INSIG1; NPC1L1; NSDHL; SCD; SOD1
GO:0042572	retinol metabolic process	1,33*10 ⁻⁰⁶	BCMO1; DGAT2; LRAT; RDH11; SDR16C5
GO:0055085	transmembrane transport	1,44*10 ⁻⁰⁵	ABCB1; ABCG8; APOA1; ATP6V1B2; EBP; KCNJ13; LDLR; SCNN1A; SCN3B; SLC5A4; SLC5A11; SLC6A8; SLC10A2; SLC14A2; SLC22A17; SLC23A1; SLC30A4; SLC46A1; TRPV6;
GO:0006766	vitamin metabolic process	3,98*10 ⁻⁰⁵	BCMO1; CUBN; ISX; LRAT; QPRT; SLC23A1; SLC46A1
GO:0015918	sterol transport	0,00020	ABCG8; APOA1; LDLR; NPC1L1;

			SREBF2
GO:0009583	detection of light stimulus	0,00032	APOA1; BCMO1; LDLR; LRAT; RDH11; SDR16C5
GO:0044241	lipid digestion	0,00038	ABCG8; LDLR; NPC1L1
GO:0042574	retinal metabolic process	0,00038	BCMO1; RDH11; SDR16C5
GO:0048878	chemical homeostasis	0,00047	ABCG8; APOA1; ATP6V1B2; CYP7A1; DGAT2; LDLR; SCNN1A; SCN3B; SLC22A17; SLC30A4; SLC46A1; SOD1; SREBF2
GO:0009416	response to light stimulus	0,00081	APOA1; BCMO1; CRIP1; HMGCR; LDLR; LRAT; RDH11; SDR16C5
GO:0006811	ion transport	0,00087	ABCG8; ADA; APOA1; ATP6V1B2; KCNJ13; LDLR; SCNN1A; SCN3B; SLC5A4; SLC5A11; SLC6A8; SLC10A2; SLC22A17; SLC23A1; SLC30A4; SLC46A1; TRPV6
GO:0015850	organic hydroxy compound transport	0,00118	ABCG8; APOA1; LDLR; NPC1L1; SLC6A8; SREBF2
GO:0046460	neutral lipid biosynthetic process	0,00143	DGAT2; GK; LDLR; PNPLA3
GO:0015893	drug transport	0,00143	ABCB1; EBP; SLC46A1
GO:0007602	phototransduction	0,00143	APOA1; BCMO1; LDLR; LRAT; RDH11
GO:0006638	neutral lipid metabolic process	0,00143	DGAT2; GK; INSIG1; LDLR; PNPLA3
GO:0008299	isoprenoid biosynthetic process	0,00152	BCMO1; HMGCR; IDI1
GO:0051180	vitamin transport	0,00186	CUBN; SLC23A1; SLC46A1
GO:0035382	sterol transmembrane transport	0,00252	APOA1; LDLR
GO:0022600	digestive system process	0,00252	ABCG8; APOA1; LDLR; NPC1L1
GO:0046486	glycerolipid metabolic process	0,00412	APOA1; DGAT2; GK; INSIG1; LDLR; PIK3C2G; PNPLA3
GO:0045017	glycerolipid biosynthetic process	0,00412	APOA1; DGAT2; GK; LDLR; PIK3C2G; PNPLA3
GO:0006869	lipid transport	0,00465	ABCG8; APOA1; LDLR; NPC1L1; SREBF2; STARD4
GO:0090407	organophosphate biosynthetic process	0,00498	ADA; APOA1; DGAT2; GK; GUCA2A; IDI1; QPRT; PIK3C2G; PNPLA3
GO:0006812	cation transport	0,00498	ADA; ATP6V1B2; KCNJ13; SCNN1A; SCN3B; SLC5A4; SLC5A11; SLC6A8; SLC10A2; SLC23A1; SLC30A4; TRPV6
GO:0015711	organic anion transport	0,00672	APOA1; ABCG8; LDLR; SLC6A8; SLC10A2; SLC23A1; SLC46A1
GO:1901678	iron coordination entity transport	0,00709	SLC22A17; SLC46A1
GO:0015914	phospholipid transport	0,00854	ABCG8; APOA1LDLR
GO:0019915	lipid storage	0,01220	APOA1; DGAT2;SREBF2
GO:0006644	phospholipid metabolic process	0,01262	APOA1; DGAT2; IDI1; LDLR; PIK3C2G; PNPLA3
GO:0042157	lipoprotein metabolic	0,01278	APOA1; CUBN; LDLR; NPC1L1

	process		
GO:0006732	coenzyme metabolic process	0,01278	FMO1; DGAT2; HMGCR; QPRT; SLC46A1
GO:0006855	drug transmembrane transport	0,01284	ABCB1; EBP
GO:0034383	low-density lipoprotein particle clearance	0,01414	DGAT2; LDLR
GO:0008654	phospholipid biosynthetic process	0,01506	APOA1; DGAT2; IDI1; PIK3C2G; PNPLA3
GO:1901616	organic hydroxy compound catabolic process	0,01620	CYP7A1; GK; LDLR
GO:0010460	positive regulation of heart rate	0,01642	ADA; SCN3B
GO:0051051	negative regulation of transport	0,01770	ABCG8; ADA; APOA1; HMGCR; INSIG1; SREBF2
GO:0015748	organophosphate ester transport	0,01857	ABCG8; APOA1; LDLR
GO:0006071	glycerol metabolic process	0,02242	DGAT2; GK
GO:0043436	oxoacid metabolic process	0,02307	CYP7A1; DPEP1; INSIG1; LRAT; QPRT; SCD; SLC6A8; SLC10A2; SLC23A1; SLC46A1; SOD1
GO:0006820	anion transport	0,02307	ABCG8; APOA1; LDLR; SLC6A8; SLC10A2; SLC23A1; SLC46A1
GO:0044057	regulation of system process	0,02366	ABCG8; ADA; APOA1; HMGCR; SCN3B; SOD1

^a ID = Identifikator

^b entspricht dem mittels FDR Methode korrigiertem p-Wert

Tabelle 7 Darstellung der überrepräsentierten *Gene Ontology* Terme, sowie der jeweils assoziierten Gene des Vergleichs Roux-Schenkel vs. Jejunum

Roux-Schenkel vs. Jejunum			
GO-ID ^a	Termname	q-Wert ^b	zugeordnete Gene
GO:0006066	alcohol metabolic process	0,00004	APOA1; CUBN; CYP51A1; CYP7A1; DHCR24; ENPP7; HMGCS2; INSIG1; NR0B2; PLA2G4C
GO:0044283	small molecule biosynthetic process	0,00004	APOA1; APOC2; BCMO1; CYP51A1; CYP7A1; DHCR24; HMGCS2; INSIG1; PDK4; RGN; SCD
GO:0008202	steroid metabolic process	0,00004	APOA1; CUBN; CYP51A1; CYP7A1; DHCR24; HMGCS2; INSIG1; NR0B2; SLC10A2
GO:0008610	lipid biosynthetic process	0,00004	APOA1; APOC2; BCMO1; CYP51A1; CYP7A1; DHCR24; HMGCS2; INSIG1; PDK4; PLA2G4C; PNPLA3; SCD
GO:0014070	response to organic cyclic compound	0,00021	ALDOC; APOA1; CDKN2B; CYP7A1; DUSP6; DUSP1; IL18; JUN; NR0B2; PAQR7; PELI1; THBS1
GO:0033993	response to lipid	0,00072	APOA1; CYP7A1; DUSP1; IL18; JUN; LITAF; NR0B2; PAQR7; PDK4; PELI1; THBS1

GO:0051051	negative regulation of transport	0,00074	ANXA13; APOA1; APOC2; INSIG1; LITAF; THBS1; TNFRSF21; VIP
GO:0006720	isoprenoid metabolic process	0,00165	APOA1; APOC2; BCMO1; HMGCS2; RDH11
GO:0010901	regulation of very-low-density lipoprotein particle remodeling	0,00328	APOA1; APOC2;
GO:0009966	regulation of signal transduction	0,00484	APOA1; ARHGDIG; CDKN2B; DUSP1; DUSP6; ERFF1; IL18; JUN; LITAF; LTBP1; PELI1; PER1; RDH11; RGN; RHOBTB1; SSX2IP; THBS1; TNFSF15; VIP
GO:0001817	regulation of cytokine production	0,00484	APOA1; IL18; LITAF; PELI1; PER1; THBS1; TNFSF15; TNFRSF21
GO:0015711	organic anion transport	0,00484	APOA1; APOC2; HBA1; HBB; SLC10A2; SLC46A1; THBS1
GO:0006820	anion transport	0,00484	APOA1; APOC2; GABRB2; HBA1; HBB; SLC10A2; SLC46A1; THBS1
GO:0032880	regulation of protein localization	0,00484	ANXA13; APOA1; ARHGDIG; IL18; LITAF; TNFSF15; TNFRSF21; VIP
GO:0010646	regulation of cell communication	0,00487	APOA1; ARHGDIG; CDKN2B; DUSP1; DUSP6; ERFF1; IL18; JUN; LITAF; LTBP1; NR0B2; PELI1; PER1; RDH11; RGN; RHOBTB1; THBS1; TNFSF15; SSX2IP; VIP
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	0,00515	DUSP1; HBA1; HBB; JUN
GO:0001935	endothelial cell proliferation	0,00585	APOA1; JUN; THBS1; VIP
GO:0034384	high-density lipoprotein particle clearance	0,00585	APOA1; APOC2
GO:1901617	organic hydroxy compound biosynthetic process	0,00592	APOA1; CYP51A1; DHCR24; HMGCS2; INSIG1
GO:0010941	regulation of cell death	0,00679	CIDEC; DHCR24; DUSP1; DUSP6; GABRB2; HBA1; HBB; JUN; PDK4; SGK1; THBS1; TNFSF15; VIP
GO:0051049	regulation of transport	0,00679	ANXA13; APOA1; APOC2; IL18; INSIG1; LITAF; NR0B2; PER1; SGK1; THBS1; TNFSF15; TNFRSF21; VIP
GO:1901678	iron coordination entity	0,00715	SLC22A17; SLC46A1
GO:0007602	phototransduction	0,00715	APOA1; APOC2; BCMO1; RDH11
GO:0009416	response to light stimulus	0,00718	APOA1; APOC2; DUSP1; BCMO1; PER1; RDH11
GO:0016053	organic acid biosynthetic process	0,00721	APOC2; CYP7A1; INSIG1; PDK4; RGN SCD
GO:0006811	ion transport	0,00721	APOA1; APOC2; GABRB2; HBA1; HBB; PER1; SCNN1A; SGK1; SLC10A2; SLC22A17; SLC46A1; THBS1; VIP
GO:0031100	organ regeneration	0,00721	ALDOC; APOA1; NR0B2
GO:0035556	intracellular signal transduction	0,00730	APOA1; ARHGDIG; DHCR24DUSP1; DUSP6; IL18; JUN; LITAF; PELI1; PER1; PLA2G4C; RAB30; RGN;

			RHOBTB1; SSX2IP; THBS1; TNFSF15
GO:0009583	detection of light stimulus	0,00730	APOA1; APOC2; BCMO1; RDH11
GO:0032616	interleukin-13 production	0,00730	IL18; TNFRSF21
GO:0042574	retinal metabolic process	0,00730	BCMO1; RDH11
GO:0042953	lipoprotein transport	0,00823	APOC2; CUBN
GO:0006766	vitamin metabolic process	0,00861	BCMO1; CUBN; RGN; SLC46A1
GO:0015671	oxygen transport	0,01017	HBA1; HBB
GO:0007369	gastrulation	0,01119	APOA1; DUSP1; DUSP6; NAT8
GO:0000302	response to reactive oxygen species	0,01145	DUSP1; HBA1; HBB; JUN
GO:0012501	programmed cell death	0,01290	ALDOC; CIDEC; DHCR24DUSP1; DUSP6; GABRB2; JUN; LITAF; PDK4; SGK1; THBS1; TNFSF15; TNFRSF21; VIP
GO:0071310	cellular response to organic substance	0,01305	APOA1; CDKN2B; CYP7A1; DUSP1; DUSP6; IL18; JUN; LITAF; LTBP1; NR0B2; PAQR7; PDK4; THBS1; TNFRSF21
GO:0015669	gas transport	0,01534	HBA1; HBB
GO:0042744	hydrogen peroxide	0,01595	HBA1; HBB
GO:0090287	regulation of cellular response to growth factor stimulus	0,01595	CDKN2B; DUSP6; LTBP1; THBS1
GO:0006796	phosphate-containing compound metabolic process	0,01595	ALDOC; ALPI; APOA1; APOC2; ARHGDIG; CDKN2B; DUSP1; DUSP6; ENPP7; ERRF1; IL18; JUN; PDK4; PER1; PLA2G4C; PNPLA3; RAB30; RGN; SGK1; THBS1; TNFSF15; VIP
GO:0034367	macromolecular complex	0,01595	APOA1; APOC2
GO:0034369	plasma lipoprotein	0,01595	APOA1; APOC2
GO:0042572	retinol metabolic process	0,01595	BCMO1; RDH11
GO:0008299	isoprenoid biosynthetic process	0,01698	BCMO1; HMGCS2
GO:0009110	vitamin biosynthetic process	0,01792	BCMO1; RGN
GO:0043086	negative regulation of catalytic activity	0,01792	APOA1; APOC2; CDKN2B; DHCR24; DUSP1; DUSP6; ERRF1; THBS1
GO:0051180	vitamin transport	0,01869	CUBN; SLC46A1
GO:0006644	phospholipid metabolic process	0,01985	APOA1; APOC2; ENPP7; PLA2G4C; PNPLA3
GO:0051129	negative regulation of cellular component organization	0,02082	ANXA13; APOA1; APOC2; DUSP1; INSIG1; THBS1
GO:0031102	neuron projection regeneration	0,02336	APOA1; JUN
GO:0046486	glycerolipid metabolic process	0,02483	APOA1; APOC2; INSIG1; PLA2G4C; PNPLA3;
GO:0006631	fatty acid metabolic process	0,02594	APOC2; INSIG1; PDK4; PLA2G4C; SCD
GO:0048878	chemical homeostasis	0,02594	APOA1; APOC2; CYP7A1; PDK4; RGN; SCNN1A; SLC22A17; SLC46A1

GO:0071825	protein-lipid complex subunit organization	0,02705	APOA1; APOC2
GO:0048523	negative regulation of cellular process	0,02705	ANXA13; APOA1; ARHGDIG; CDKN2B; DHCR24; DUSP1; DUSP6; ENPP7; ERFF1; GABRB2; INSIG1; JUN; LTBP1; NR0B2; PDK4; PELI1; PER1; THBS1; TNFRSF21; VIP
GO:0042107	cytokine metabolic process	0,02705	IL18; THBS1 TNFSF15
GO:0071560	cellular response to transforming growth factor beta stimulus	0,02745	CDKN2B; JUN; LTBP1; THBS1
GO:0006638	neutral lipid metabolic process	0,03035	APOC2; INSIG1; PNPLA3
GO:0048545	response to steroid hormone	0,03149	APOA1; DUSP1; NR0B2; PAQR7; THBS1
GO:0007050	cell cycle arrest	0,03204	CDKN2B; DHCR24; DUSP1; THBS1
GO:0042743	hydrogen peroxide metabolic process	0,03220	HBA1; HBB
GO:0050790	regulation of catalytic activity	0,03386	APOA1; APOC2; ARHGDIG; CDKN2B; DHCR24; DUSP1; DUSP6; ERFF1; JUN; RGN; SGK1; THBS1; TNFSF15; VIP
GO:0070997	neuron death	0,03386	DHCR24; GABRB2; JUN; TNFRSF21
GO:0043436	oxoacid metabolic process	0,03386	APOC2; CYP7A1; INSIG1; PDK4; PLA2G4C; RGN; SCD; SLC10A2; SLC46A1
GO:0042157	lipoprotein metabolic process	0,03386	APOA1; APOC2; CUBN
GO:0060341	regulation of cellular localization	0,03386	ANXA13; APOA1; INSIG1; IL18; LITAF; NR0B2; TNFSF15; TNFRSF21
GO:0032496	response to lipopolysaccharide	0,03386	IL18; JUN; LITAF; PELI1
GO:0006869	lipid transport	0,03386	APOA1; APOC2; STARD4; THBS1

^a ID = Identifikator

^b entspricht dem mittels FDR Methode korrigiertem p-Wert

Selbstständigkeitserklärung nach § 8 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbständig von mir erarbeitet und zusammengestellt wurde, sowie unter Einhaltung der Regeln für gute wissenschaftliche Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt wurde. Ferner erkläre ich hiermit, dass diese Arbeit von mir bisher weder bei der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel noch an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

Der Inhalt dieser Arbeit wurde zur Veröffentlichung eingereicht:

Henrike Bruckmueller, Werner Siegmund, Christiane Modess, Anneke Nina Werk, Robert Häsler, Sierk Haenisch, Markus Grube, Jörn Bernhardt, Stefan Oswald, Ingolf Cascorbi, Kaja Ludwig. Roux-en-Y gastric bypass (RYGB) induces mRNA and microRNA adaptation processes in the small intestine of obese patients.

Kiel, im Februar 2016

Henrike Bruckmüller