

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchung gastrointestinaler Transporter und ihrer microRNA-abhängigen Regulation

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Paul Max Martin

aus Kiel

Kiel 2018

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Arlt
Tag der mündlichen Prüfung:	10.12.2018
Zum Druck genehmigt, Kiel den:	28.10.2018

gez.:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Orale Arzneimittelapplikation.....	1
1.2 Rolle von Influx- und Effluxtransportern bei der Absorption von Arzneistoffen.....	3
1.3 Die Expression von Transporterproteinen im Gastrointestinaltrakt.....	4
1.3.1 Transporterprotein-Expression in Abhängigkeit des Darmabschnittes.....	5
1.4 microRNAs	7
1.4.1 Biogenese.....	8
1.4.2 Postranskriptionale Regulation durch microRNAs	9
1.5 Ziele.....	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Gewebeproben.....	12
2.2 Genomweites microRNA-Screening	13
2.2.1 RNA Isolation.....	13
2.2.2 Die Isolation der RNA (inklusive microRNA und mRNA) erfolgte in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald. Hierzu wurden die Gesamt-RNA aus 20-30 mg des zuvor gewonnenen Gewebes mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Qualität und Quantität wurden mit einem NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt.Reverse Transkription	13
Reverse Transkription für das genomweite microRNA-Screening	13
Reverse Transkription für microRNA Individualassays	14

Reverse Transkription für mRNA Individualassays	14
2.2.3 Prinzip der quantitativen Real-Time PCR (qPCR)	14
2.2.3.1 Durchführung des genomweiten microRNA-Screenings	16
2.2.4 Clusteranalyse	16
2.2.5 In silico microRNA-Zielgen-Vorhersage	16
2.3 Untersuchung der microRNA-Zielgen-Interaktion	17
2.3.1 Vektorkonstrukte	17
2.3.2 microRNAs/precursor-microRNAs	17
2.3.3 Zellkultur	20
2.3.4 Kryokonservierung	20
2.3.5 Transiente Transfektion	21
2.3.6 Luciferase-Reporter-Gen-Assays	21
2.4 Mutagenese	24
2.4.1 Mutagenese der putativen miRNA-Bindungsstellen	24
2.4.2 Mutagenese der putativen miR-409-3p Bindungsstelle in der ABCB1- 3'-UTR	25
2.4.3 Hitzeschocktransformation kompetenter E. coli	26
Hitzeschocktransformation mit den Vektorkonstrukten aus 2.4.1	26
Hitzeschocktransformation mit den Vektorkonstrukten aus 2.4.2	26
2.4.4 Aufreinigung der Plasmid DNA	27
2.4.5 Sequenzierung	27
2.5 Proteinisolation und Quantifizierung	27
2.6 Statistik	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Genomweite Charakterisierung des microRNA-Profiles	29
3.2 Identifikation möglicher microRNA/Transporterprotein-Interaktionen .	30
3.2.1 ABCC3	33

3.2.2	ABCB1	35
3.2.3	ABCG2	36
3.2.4	PEPT1	37
3.2.5	Additive Effekte beteiligter microRNAs für ABCB1 und PEPT1	39
3.2.5.1	ABCB1 und microRNA-27a-3p und microRNA-409-3p	39
3.2.5.2	PEPT1 und microRNA-27a-3p, microRNA-193a-3p und microRNA-193b-3p.....	39
3.2.6	Zusammenfassung der Reporter-Gen-Assay Ergebnisse	41
4	Diskussion.....	42
4.1	microRNA-Expressionsmuster entlang des Darms.....	44
4.2	Einfluss von microRNAs auf die Transporterproteinexpression.....	45
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	55

Abkürzungsverzeichnis

3'-UTR	3'-untranslatierte Region
ABC-Transporter	ATP- <i>binding cassette</i> Transporter
AGO	Protein der Argonautenklasse
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> Wert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome chromosomal region 8</i> Microprozessor
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GTP	Guanosintriphosphat
M	mol/l
miR	microRNA
miRISC	microRNA- <i>induced silencing complex</i>
miRNA	microRNA
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
PACT	<i>protein activator of PKR</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKR	<i>dsRNA-activated protein kinase</i>
PP _i	Pyrophosphat
pre-miRNA	precursor-microRNA
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
pri-miRNA	Primäres Transkript der microRNA
qPCR	quantitative Realtime-PCR
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RGA	Reporter-Gen-Aktivität
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLC	<i>solute carrier</i>
TAR	HIV-1 <i>transactivationg response</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCM	Tris HCl, CaCl ₂ , MgCl ₂
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TRBP	TAR RNA <i>binding protein</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

Die orale Bioverfügbarkeit von Medikamenten unterliegt einer hohen intra- und interindividuellen Variabilität. Hier spielen intestinale Influx- und Effluxtransporter eine wichtige Rolle, die für einen erleichterten bzw. aktiven Transport von Arzneistoffen über die Plasmamembranen der Enterozyten sorgen. Aus einer kürzlich publizierten Studie ging hervor, dass diese im Intestinum hohen regionalen Expressionsunterschieden unterliegen und teilweise Diskrepanzen zwischen der mRNA und Proteinexpression bestehen (1). Unklar ist, inwieweit epigenetische Regulation durch lokale mikroRNA-Expression zu diesen Phänomenen beitragen.

1.1 Orale Arzneimittelapplikation

Die Verschreibung von Medikamenten ist aus der ärztlichen Arbeitswelt nicht mehr wegzudenken und spielt eine entscheidende Rolle bei der Behandlung zahlreicher Erkrankungen. Um den im Arzneimittel enthaltenen Wirkstoff an sein Ziel, den Wirkort, zu bringen, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten der Applikation. Neben transdermalen Systemen besteht beispielsweise die Möglichkeit der inhalativen, rektalen oder injektionsgebundenen Applikation. Trotz dieser großen Bandbreite an Möglichkeiten ist die meistgenutzte Form der Darreichung die orale Applikation (2). Sie ist für den Patienten in der Regel einfach und schmerzfrei durchzuführen, was mit einer erhöhten Compliance einhergeht. Durch entsprechende galenische Formulierungen kann die Geschwindigkeit der Arzneistofffreisetzung modifiziert werden (3). Auch ist die orale Applikation mit einem geringen Infektionsrisiko verbunden. Für alle systemisch wirksamen Arzneistoffe ist bei der Dauermedikation die Gesamtkörperclearance die entscheidende Bezugsgröße, um über die Dosierung und das Dosisintervall entscheiden zu können (4). Zur Berechnung der Gesamtkörperclearance bedarf es jedoch der Kenntnis des zeitlichen Profils der Arzneistoff-Plasmakonzentration. Im Idealfall kann dann die Dosierung so angepasst werden, dass die Konzentration des Arzneistoffs zu keinem Zeitpunkt unterhalb der minimalen therapeutischen Dosis liegt, aber auch zu keinem Zeitpunkt in toxische Dosisbereiche ansteigt. Eine sehr einfache berechenbare Näherung an die

Plasmakonzentration nach der Zeit für oral applizierte Medikamente ist die Bateman-Funktion (5) (Abb. 1). Sie stellt eine idealisierte, durch Interpolation von Einzelwerten generierte Kurve im Ein-Kompartimenten-Modell dar, für die eine Aufnahme beziehungsweise Elimination erster Ordnung angenommen wird.

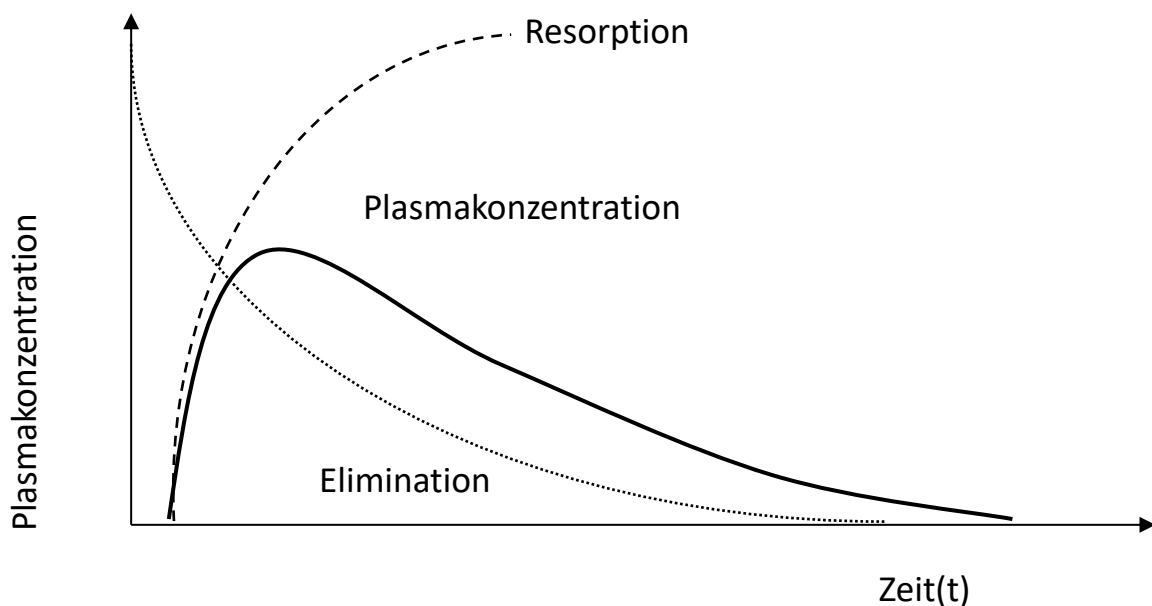


Abbildung 1: Batemanfunktion: Plasmakonzentration über die Zeit als resultierende der Resorption und Elimination eines oral verabreichten Stoffes.

Hier lassen sich die Absorptions- und die Eliminationskonstante voneinander unterscheiden. Während die Eliminationskonstante auf den Eigenschaften des Arzneimittels und dem Metabolismus des Patienten beruht, lässt sich die Absorptionskonstante teilweise durch die Galenik und das Verhalten des Patienten beeinflussen. So führt die Nahrungsaufnahme unmittelbar vor der Gabe eines Medikamentes häufig zu einer verzögerten Resorption, während die gleichzeitige

Flüssigkeitsaufnahme durch eine bessere Lösung bestimmter Arzneimittel einen positiven Effekt haben kann (6).

Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Faktoren, die zu Problemen bei der oralen Applikation von Arzneistoffen führen können. Im zeitlichen Ablauf noch vor dem *First-Pass*-Metabolismus der Leber, sind es vor allem physiologische und anatomische Gegebenheiten des Intestinums, die für den Behandelnden nicht ohne Weiteres zu beeinflussen sind (7). Zu diesen Limitationen werden neben Problemen der Wasserlöslichkeit bei gleichzeitiger Membranpermeabilität vor allem gastrointestinale Influx- und Effluxtransporter gezählt (8,9). Die Vorhersage der Wirkstoff-Plasmakonzentration in Abhängigkeit von der Zeit ist also einerseits für die optimale Medikamenteneinstellung eines Patienten unablässig, erweist sich vor allem bei oraler Applikation in der Praxis aufgrund vieler Einflussgrößen und interindividueller Unterschiede allerdings als kompliziert (4). Aus diesem Grund ist es umso wichtiger die beteiligten Faktoren, insbesondere auch die intestinalen Transporterprozesse, besser zu verstehen.

1.2 Rolle von Influx- und Effluxtransportern bei der Absorption von Arzneistoffen

Die Gruppe der relevanten arzneistofftransportierenden Proteine, die im menschlichen Gastrointestinal-Trakt zu finden sind, lassen sich in zwei Subgruppen einteilen: die der *solute carrier (SLC) family* und der *ATP-binding cassette (ABC) family* (10). Transporter der SLC-Familie sind zum Großteil Influxtransporter. Sie wirken als Kanal oder Uniporter, können allerdings auch gegen ein Konzentrationsgefälle als sekundär aktive Transporter arbeiten (11). Transporter spielen allerdings nicht nur bei der Aufnahme von Pharmaka eine Rolle, sondern auch bei deren Elimination. So handelt es sich bei den Transportern der ABC-Familie primär um Effluxtransporter. Sie hydrolysieren ATP und nutzen die hierbei gewonnene Energie zum Stoffexport vom intrazellulären in den extrazellulären Raum. Dass der Einfluss von Transporterproteinen auf die Arzneistoffaufnahme lange Zeit unterschätzt wurde, konnten Dobson *et al.* in einer Metaanalyse zeigen (12).

1.3 Die Expression von Transporterproteinen im Gastrointestinaltrakt

Im Rahmen der Resorption oral verabreichter Medikamente spielen SLC- und ABC-Transporter im Gastrointestinaltrakt eine wichtige Rolle (13). Transporter der SLC-Familie sind apikal in den *Villi intestinales* exprimiert und fungieren dort als Influxtransporter. Sie lassen sich in unterschiedliche Subgruppen einteilen, wobei im Folgenden nur die für diese Arbeit relevanten Transporter Erwähnung finden. Während SLCOs (*solute carrier organic anion transporter*, auch OATPs: *organic anion transporting polypeptide*) für den Natrium-unabhängigen Import amphiphatischer Stoffe verantwortlich sind (14), fungieren SLC22s (*solute carrier* der Familie 22, auch OCT(N)s: *organic cation transporter* oder OATs: *organic anion transporter*) als Uniporter, Antiporter oder Natrium-abhängige Sekundärtransporter (15). Die SLC10-Familie setzt sich aus Importern von Gallensäuren, Steroidhormonen, Xenobiotika und diversen anderen Substraten zusammen (16). In der Familie der SLC15A ist im Intestinum vor allem der Peptidtransporter 1 (PEPT1, Gen: *SLC15A1*) von Interesse, der sowohl Di- und Tripeptide als auch Xenobiotika tertiär aktiv über einen Protonengradienten Richtung Cytosol transportiert (17).

Transporter der ABC-Familie sind primär aktiv und in Enterocyten entweder apikal als Effluxtransporter Richtung Darmlumen oder basolateral als Transporter Richtung *Vena portae hepatis* zu finden. Sie sind also entweder für die direkte Elimination des zuvor in das Cytosol aufgenommenen Substrates verantwortlich oder sorgen für dessen Weiterleitung Richtung Körperkreislauf. Auch hier lassen sich unterschiedliche Subfamilien unterscheiden, wobei für den intestinalen Transport von Xenobiotika die Subgruppen ABCB, ABCC und ABCG von Bedeutung sind (18). Die Namen dieser Transporter basieren auf der Tatsache, dass sie in der Resistenz von Krebszellen gegen Chemotherapeutika eine große Rolle zu spielen scheinen (19). Zur Gruppe der ABCB Transporter zählt mit dem *Multidrug-Resistance-Protein 1* (MDR1, auch *permeability glycoprotein* – kurz: *p-GP*, Gen: *ABCB1*) der wohl am besten untersuchte Transporter der ABC-Klasse. Aus der ABCC-Klasse interessieren besonders das *Multidrug-Resistance-Associated-Protein 2* und *3* (kurz: MRP2/MRP3, Gen: *ABCC2/ABCC3*), aus der ABCG-Klasse das *Breast-Cancer-Resistance-Protein* (kurz: BCRP, Gen: *ABCG2*) (10).

Im Rahmen der Aufnahme und Abgabe von Xenobiotika wäre es nun von großem Interesse nicht nur zu wissen, welche Transporter beteiligt sind, sondern auch die Regulation ihrer Expression entlang des Darmes zu verstehen. Da der Darm sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch von oral nach aboral deutlich verändert und lokal sehr starke Unterschiede in unterschiedlichen Abschnitten aufweist, liegt die Vermutung nahe, dass sich auch die Expression der oben genannten Transporterproteine in den unterschiedlichen Darmabschnitten unterscheidet. Diese These lässt sich durch zahlreiche Studien stützen, die eine ortsabhängige Medikamentenaufnahme entweder nach bariatrischen Eingriffen mit Veränderung der Anatomie des Darms (20,21) oder durch endoskopiegestützte Arzneimittelapplikation an unterschiedlichen Darmsegmenten nachweisen konnten (22,23). Um einen Überblick über die Expressionslevel im physiologischen Magen-Darm-Trakt zu bekommen, wäre es am sinnvollsten gesunde oder wenigstens nicht am Gastrointestinaltrakt erkrankte Probanden zu gewinnen und deren Intestinum von oral nach aboral mehrfach zu biopsieren. Der Großteil vorangegangener Studien erfasste das Gewebe erkrankter Patienten, wobei die Biopsate meist per Endoskopie gewonnen wurden (24-27). Dies hat zur Folge, dass meist kein jejunales und ileales Gewebe erfasst werden konnte, obwohl diese Darmabschnitte insbesondere bei der Absorption von Retardpräparaten eine entscheidende Rolle spielen (28). Zudem sind pathologische Veränderungen des Intestinums wie chronisch entzündliche Darmerkrankungen dafür bekannt, die Genexpression von Transportsystemen zu verändern (29).

Somit fehlten also lange Zeit quantitative Daten zur Transporter-Expression entlang des gesamten menschlichen, nicht pathologisch veränderten Darms. Erst Drozdik *et al.* (2014) gelang es, Proben des gesamten Darmtraktes auf die mRNA- und Proteinmenge von Transporterproteinen zu untersuchen.

1.3.1 Transporterprotein-Expression in Abhängigkeit des Darmabschnittes

Drozdik *et al.* konnten zeigen, dass sich die gemessenen absoluten Mengen an Transporterproteinen regional zwischen Dün- und Dickdarm zum Teil stark

unterschieden (Abb. 2). Weiterhin zeigte sich eine Diskrepanz zwischen mRNA-Menge und der Proteinmenge, insbesondere bezüglich des Transporters ABCC3 (Abb. 3). Die unterschiedliche Verteilung der Transporter entlang des Darms könnte auf ihre unterschiedliche Funktion als Influx- oder Effluxtransporter zurückgeführt werden. Diese Verteilung könnte auf bestimmte Absorptions- und Resorptionsfenster entlang des Darms hindeuten, die beispielsweise für den enterohepatischen Kreislauf von Bedeutung sind (1). Die Unterschiede in mRNA- und Proteinmenge insbesondere von ABCC3 könnten wiederum durch epigenetische oder post-transkriptionale Regulationsmechanismen, wie zum Beispiel die durch microRNAs hervorgerufene RNA-Interferenz (30), erklärt werden.

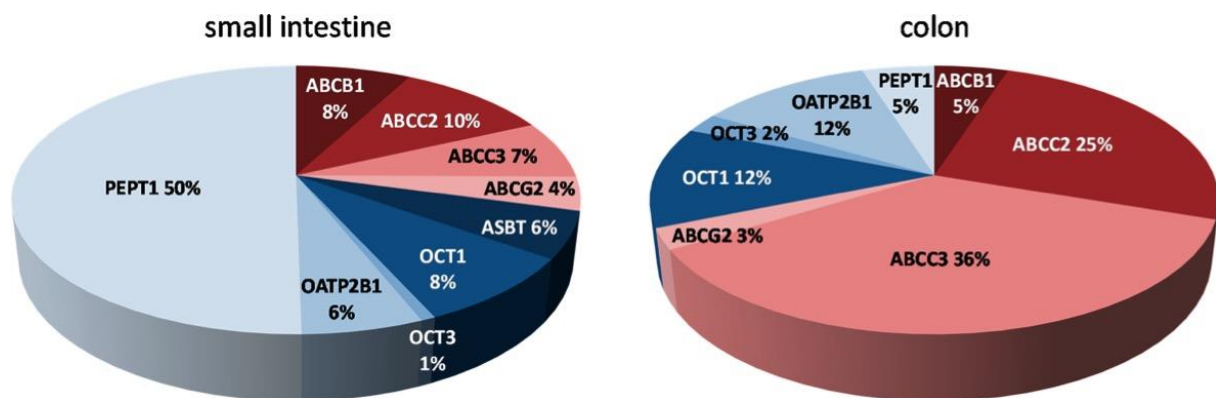


Abbildung 2: Transporterverteilung im Dün- und Dickdarm

Dargestellt ist die durchschnittliche prozentuale Verteilung der an sechs Organspendern gemessenen Transporterproteinmenge in Dün- und Dickdarm. Drozdik *et al.* 2014 (29) .

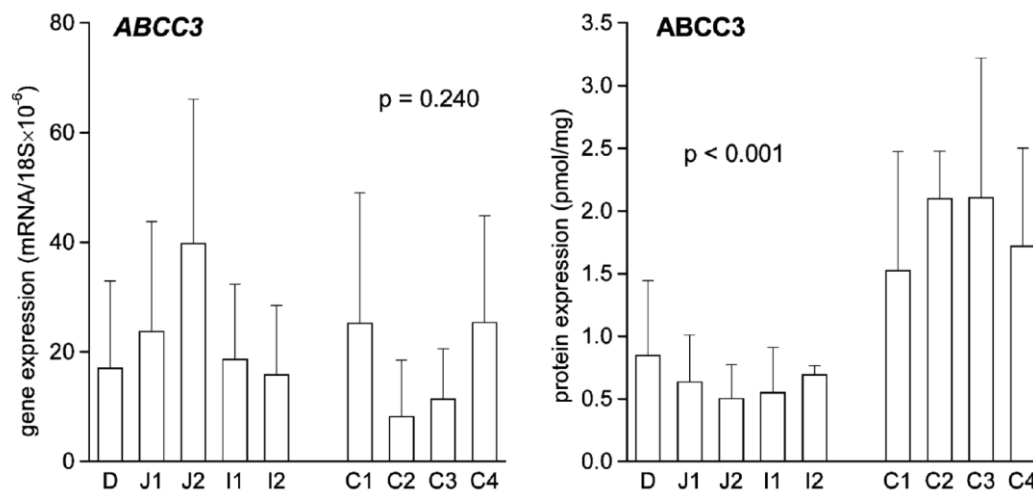


Abbildung 3 mRNA- und Proteinexpression von ABCC3

Aufgezeigt ist sowohl die mRNA-Expression von ABCC3 (links) und die absolute Proteinmenge von ABCC3 (rechts). Die p-Werte beziehen sich auf den Vergleich der Expressionsdaten zwischen Dünn- und Dickdarm (Mann-Whitney-U-Test; D = Duodenum, J = Jejunum, I = Ileum, C= Colon) Drodzik *et al.* 2014 (1).

1.4 microRNAs

MicroRNAs sind 21-24 Nukleotide-lange, einzelsträngige RNAs, die über RNA-Interferenz als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression wirken. MicroRNAs sind sowohl in Tieren und Pflanzen als auch in einzelligen Eukaryoten zu finden (31,32). Es wird geschätzt, dass etwa 20% - 60% Prozent des humanen Genoms durch eine oder mehrere microRNAs reguliert werden (3,33,34). Durch ihre Funktionsweise tragen sie zur Robustheit des Organismus bei Störungen der normalen Translation bei, indem sie die Wirkung anormaler Transkripte abschwächen und eine willkürliche Fluktuation in der Anzahl von Transkripten abmildern (34). Sie sind beispielsweise an der embryonalen Organogenese des Herzens beteiligt (30,35,36), spielen bei der Entstehung und Resistenzentwicklung von Krebs eine Rolle (37-39) und werden mit zahlreichen anderen Erkrankungen assoziiert (40-42). Es konnte bereits gezeigt werden, dass microRNAs an der Regulation epithelialer Differenzierung im Intestinum beteiligt sind (43) und sie wurden als wichtige

Steuerelemente in der Expressionsregulation unterschiedlicher Transporterproteine beschrieben (44). Somit erscheint auch eine Regulation der intestinalen Transporter der ABC- und SLC-Familie als wahrscheinlich.

1.4.1 Biogenese

Die für die microRNAs kodierenden Gene wurden sowohl in Exons, die für Proteine kodieren, wie auch in nicht kodierenden DNA-Abschnitten gefunden (45). Die Transkription dieser Gene erfolgt normalerweise durch die RNA-Polymerase II, seltener durch die RNA Polymerase III (46,47). Diese primären Transkripte (*primary* microRNAs, kurz: pri-miRNAs) können mehrere hundert Basenpaare lang sein und besitzen normalerweise eine oder mehrere Haarnadelstrukturen (45). Mehrere Haarnadelstrukturen in der pri-miR können im Weiteren zu mehreren microRNAs prozessiert werden (45,48). Im Zellkern werden diese Haarnadelstrukturen der pri-miRNAs an ihrer Basis durch einen Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem RNA Bindeprotein DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8) und der RNase-III Drosha, herausgeschnitten (49-51). Die entstandene doppelsträngige RNA wird precursor-microRNA (pre-miR) genannt. Sie ist circa 60-70 Basenpaare lang, besitzt einen 5'-Phosphatrest, einen zwei Nukleotide langen 3'-Überhang und wird durch einen Exportkomplex aus Exportin 5 und RanGTP aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (52). Exportin 5 erkennt die pre-miR an dem Überhang am 3'-Ende (53). Im Zytoplasma wird die terminale Haarnadelschleife durch die RNase-III Endonuklease Dicer abgeschnitten, sodass ein reifer microRNA-Doppelstrang von der Länge von circa 22 Nukleotiden entsteht (auch microRNA-Duplex) (30,54,55). Dies geschieht im *RISC-loading complex* (RLC), der sich aus Dicer, einem Protein der Argonautenklasse (Ago) und entweder dem Kofaktor TRBP oder PACT zusammensetzt (56). Die Duplex-microRNA wird durch Reposition im RLC auf ein Ago-Protein geladen. Die beiden Stränge der microRNA werden durch eine Helicase in Einzelstränge getrennt, von denen einer, meist der mit dem thermodynamisch instabileren 5'-Ende (auch: *guided strand*), im RLC verbleibt, während der andere Strang (auch: *passenger strand*) entfernt wird (45,57-59) (Abb. 4).

Neben diesem als „kanonisch“ bezeichneten Weg der microRNA Biosynthese existiert ein „nicht-kanonisch“ genannter Weg. Entweder wird der intranukleäre

Mikroprozessorkomplex beispielsweise durch Erzeugen der pre-miR durch Spliceosomen umgangen oder der zytoplasmatische von Dicer abhängige Schritt wird übersprungen, indem microRNAs direkt an Argonautenproteine binden (57). Letzteres wurde bislang nur für die micro-RNA 451 gezeigt (59).

1.4.2 Postranskriptionale Regulation durch microRNAs

Die im RISC verbliebene microRNA führt diesen zur Bindestelle der Ziel-mRNA. Diese liegt normalerweise in der 3'-UTR. Dort kommt es meistens nicht zur vollständig korrekten Bindung der microRNA an den komplementären Strang, sondern zu Fehlpaarungen und Ausbuchtungen. Entscheidend für die postranskriptionale Regulation ist die korrekte Bindung der seed-Region. Diese befindet sich am 5'-Ende der microRNA und reicht von Nukleotid 2 bis Nukleotid 8 (31). Bei perfekter Paarung der seed-Region mit der Ziel-mRNA kann diese durch die RNase H-artige Aktivität von Ago2 degradiert werden. Sollte die seed-Region der microRNA nicht genau zu der Zielregion komplementär sein, kann über eine kompensatorische Bindung der 3'-Region der microRNA an die Zielregion zu einer Repression der Proteintranslation erfolgen (60). Aufgrund dieses Mechanismus, der Kürze der seed-Region und der damit verbundenen geringen Spezifität, kann eine microRNA mehrere unterschiedliche mRNAs regulieren (48).

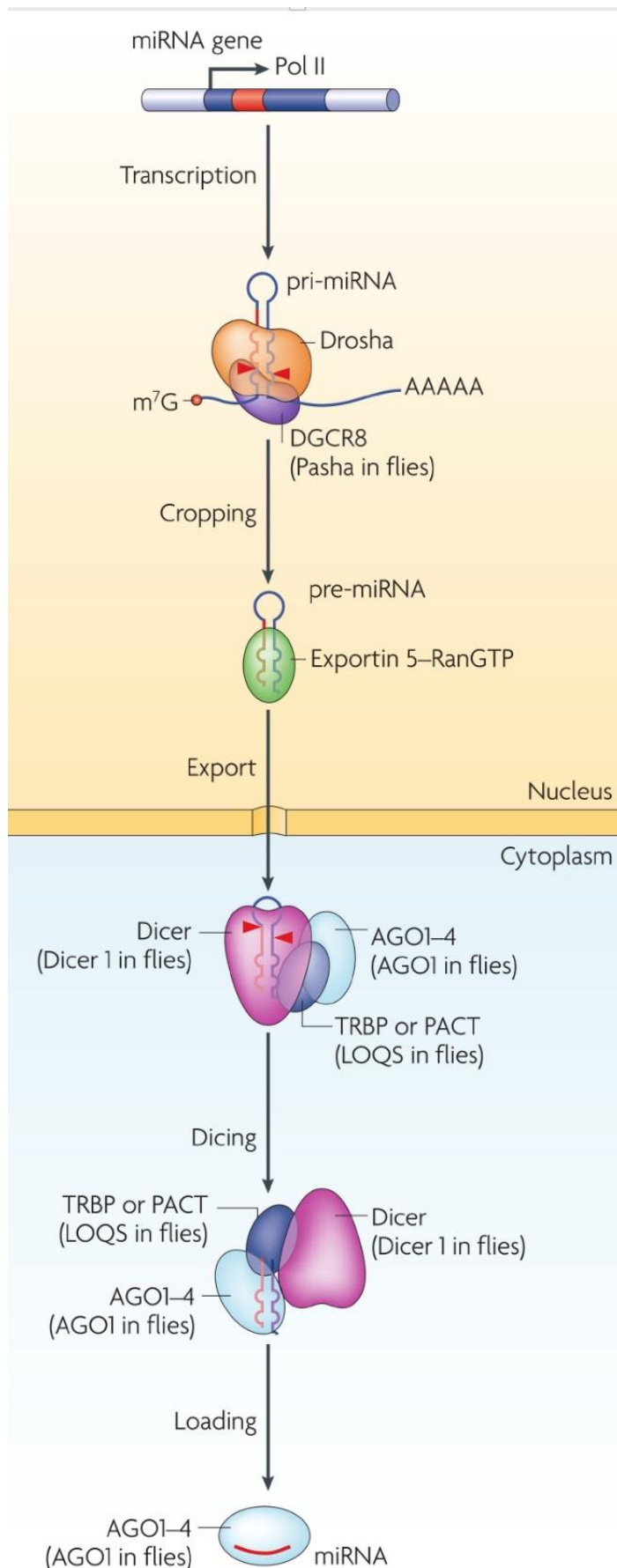


Abbildung 4: Kanonischer Weg der miRNA Biogenese

Dargestellt ist der kanonische Weg der miRNA Biogenese modifiziert nach Kim *et al.* (45); pri-miRNA = primäres Transkript der microRNA, DGCR8 = *DiGeorge syndrome chromosomal region 8*, pre-miRNA = precursor-microRNA, RanGTP = *Ras-related nuclear protein* Guanosintriphosphat, AGO = Protein der Argonautenklasse, TRBP = *HIV-1 transactivation response RNA binding protein*, PACT = *protein activator of dsRNA-activated protein kinase*

1.5 Ziele

Aufbauend auf der Beobachtung von Drozdik *et al.*, die einerseits eine unterschiedliche regionale Expression von Transportern in Dünn- und Dickdarm nachwiesen und andererseits eine deutliche Diskrepanz zwischen gemessener mRNA-Expression und Proteinmenge von ABCC3 beobachteten, war das Ziel dieser Arbeit a) die Analyse der regionalen Expressionsmuster der im menschlichen Gastrointestinaltrakt unter physiologischen Bedingungen vorkommenden microRNAs, b) die Untersuchung ob und welche microRNAs an der Regulation der Expressions ausgewählter intestinaler Influx- und Effluxtransporter beteiligt sind und c) ob sich die beobachtete Diskrepanz der ABCC3 mRNA und Proteinexpression auf die Regulation durch miRNAs zurückführen lässt Hierfür standen Aliquots der Biopsate aus der Studie von Drozdik *et al.* zur Verfügung. Diese umfassten Proben aus dem Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon zuvor gesunder Körperspender.

2 Material und Methoden

2.1 Gewebeproben

Die zu Grunde liegenden Biopsate wurden in der Abteilung für Allgemeine und Transplantationschirurgie der Pommerschen Medizinischen Universität, Stettin, Polen Körperspendern (n=6, 1 Frau, 5 Männer. Alter: 24-54 Jahre) entnommen, die zuvor an intrakraniellen Blutungen unterschiedlicher Genese oder durch Suizid verstorben waren. Alle Spender befanden sich vor ihrem Ableben in organisch gesundem Allgemeinzustand und waren nicht von gastrointestinalen Erkrankungen betroffen. Dies ließ sich in der anschließenden histologischen Untersuchung bestätigen, die in den Gewebeproben keine Zeichen entzündlicher oder destruierender Prozesse aufzeigte. Als Notfallmedikation wurde vor dem Eintritt des Todes nur bei zwei Patienten Dexamethason verabreicht, welches als gastrointestinaler Enzyminduktor gilt (1). Der Abstand von mehr als 24 Stunden zwischen Applikation und Probenentnahme lässt allerdings keine schwerwiegende und die Ergebnisse verfälschende Enzyminduktion erwarten (1). Alle Proben wurden entnommen bevor die Geräte abgeschaltet wurden, die die Spender am Leben erhielten. Die Biopsate wurden jeweils aus dem *Duodenum*, dem oberen und unteren *Jejunum* (1 Meter Abstand), oberen und unteren *Ileum* (1 Meter Abstand) und dem *Colon transversum* entnommen. Alle Gewebeproben wurden direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

Alle Patienten und Angehörigen der Probanden hatten ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Studie ist im Einklang mit dem polnischen Gesetz zur Organtransplantation durchgeführt und von der Ethikkommission der Pommerschen Medizinischen Universität (Stettin, Polen) befürwortend beraten worden.

2.2 Genomweites microRNA-Screening

Für das genomweite Screening der microRNA Expression wurde die zuvor extrahierte RNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR (TaqMan® Methode) auf TaqMan® MicroRNA Array Cards (Pool A und Pool B) vermessen.

2.2.1 RNA Isolation

Die Isolation der RNA (inklusive microRNA und mRNA) erfolgte in der Abteilung für Klinische Pharmakologie der Universitätsmedizin Greifswald. Hierzu wurden die Gesamt-RNA aus 20-30 mg des zuvor gewonnenen Gewebes mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert. Qualität und Quantität wurden mit einem NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt.

Da zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR cDNA als Vorlage benötigt wird, musste die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür werden Reverse Transkriptasen verwendet. Bei ihnen handelt es sich um RNA-abhängige DNA Polymerasen, die aus einzelsträngiger RNA unter Zugabe eines Primers und Nukleotiden einzelsträngige komplementäre DNA synthetisieren.

2.2.2 Reverse Transkription

2.2.2.1 Reverse Transkription für das genomweite microRNA-Screening

Bei der hier verwendeten Reversen Transkriptase handelt es sich um eine rekombinante Reverse Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämie-Virus mit RNase H-Aktivität. Hierdurch wird der RNA-Strang während der cDNA Synthese abgebaut. Als Primer wurden Megaplex® RT Primers für Pool A (v.2.1) und für Pool B (v.3.0) (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet, die für insgesamt 754 unterschiedliche microRNAs und acht Kontrollen spezifische Bindestellen aufweisen. Diese Primer sind mit einem stem-loop an ihrem 5'-Ende

besetzt und binden mit ihrem 3'-Ende an die microRNA, wodurch sie eine reverse Transkription der microRNA ermöglichen (61). Die Reaktion wurde mit dem TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben mit 400 ng RNA durchgeführt.

2.2.2.2 Reverse Transkription für microRNA Individualassays

Die Umschreibung der RNA in cDNA zum microRNA Profiling erfolgte wie in 2.2.2.1 beschrieben mit der veränderten RNA-Menge von 300 ng. Die verwendeten RT-Primer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) waren spezifisch für pre-miR-27a-3p, pre-miR-192-5p , pre-miR-193a-3p, pre-miR-193b-3p und U6snRNA, welche als interne Kontrolle fungierte (s. Tab. 1).

2.2.2.3 Reverse Transkription für mRNA Individualassays

Zur Analyse der mRNA Expression wurde die gesamte RNA mit Hilfe des Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Als Primer wurden Random Hexamer Primer benutzt. Diese bestehen aus 6 zufällig zusammengesetzten Nukleotiden, die somit unspezifisch die RNA hybridisieren. Auf diese Weise lassen sich zwar keine spezifischen Stellen transkribieren, dafür aber sicherstellen, dass alle Bereiche auf der mRNA auch auf der cDNA vertreten sind. Die verwendete Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase ist ein Gemisch aus zwei Enzymen: einer rekombinanten RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerase mit DNA entwindender Funktion und RNase Aktivität, basierend auf einem Enzym des Bakteriums *E. coli* – und einem Korrekturleseenzym. Als Ausgangsmenge wurden 300 ng RNA gewählt.

2.2.3 Prinzip der quantitativen Real-Time PCR (qPCR)

Das Prinzip der quantitativen Real-Time PCR nach der TaqMan® Methode beruht auf dem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (*fluorescence resonance energy transfer, FRET*) (62). Neben Vorwärtsprimern, Rückwärtsprimern und einer DNA-Polymerase mit 5' – 3' Exonuklease Aktivität ist eine fluorogene Sonde von zentraler Bedeutung. Sie ist ein Oligonukleotid, welches am 3'-Ende an einen fluoreszierenden

Reporter-Farbstoff und am 5'-Ende an einen Quencher-Farbstoff gekoppelt ist. Wird dieser fluoreszierende Reporter-Farbstoff nun mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, so emittiert er kein Licht, da aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher besagter Fluoreszenz-Energie-Transfer stattfindet. Während der Annealingphase der PCR lagern sich sowohl die Primer als auch die Sonde an den einzelsträngig vorliegenden Matrizenstrang an. Im Rahmen der Elongationsphase hydrolisiert die DNA-Polymerase mit ihrer Exonuklease Aktivität die Sonde, woraufhin Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt werden. Es findet kein Fluoreszenz-Energie-Transfer vom Reporter auf den Quencher mehr statt. Der Reporter emittiert nun ein Fluoreszenzsignal, welches gemessen und quantifiziert werden kann, da mit Zunahme der DNA-Synthese auch die Signalstärke des emittierten Lichtes zunimmt. Als Messwert wird der C_T -Wert verwendet. Dieser gibt an, bei welcher Anzahl von PCR-Zyklen die Fluoreszenzemission sich deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt. Diese überschrittene Grenze wird als *threshold* bezeichnet. Der C_T -Wert ist immer umgekehrt proportional zur vorhandenen Startkopienzahl – also der Menge an cDNA. Je kleiner der C_T -Wert, je weniger PCR-Zyklen also nötig waren, damit der *threshold* überschritten wurde, desto mehr cDNA lag im Ansatz vor.

Die erhaltenen C_T -Werte lassen sich nach zwei unterschiedlichen Methoden auswerten. Man unterscheidet die absolute Quantifizierung von der relativen Quantifizierung. Bei der relativen Quantifizierung werden die C_T -Werte der zu untersuchenden Proben mit den C_T -Werten endogener Referenzgene verglichen. Zur Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (63) wird also eine endogene Kontrolle zur Normalisierung benötigt. Hierfür eignen sich Gene, die ubiquitär exprimiert werden. Als endogene Kontrolle wurde in diesem Fall U6snRNA für die microRNA-Analyse und 18S für die mRNA-Analyse ausgewählt, da sie über alle Proben die geringste Varianz aufwiesen. Als erster Schritt erfolgt die Normalisierung des C_T -Wertes des Zielgens. Hierfür wird von diesem der C_T -Wert der Kontrolle subtrahiert ($\Delta C_T = C_T [\text{Zielgewebe}] - C_T [\text{endogene Kontrolle}]$). Anschließend wird von dem normalisierten ΔC_T -Wert des zu untersuchenden Gewebes der ΔC_T -Wert des Kontrollgewebes abgezogen ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T [\text{untersuchtes Gewebe}] - \Delta C_T [\text{Kontrollgewebe}]$). Der relative Expressionsunterschied zwischen Ziel- und Kontrollgewebe ergibt sich aus folgender Exponentialfunktion: $X = 2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Durchführung des genomweiten microRNA-Screenings

Zur Durchführung der qRT-PCR wurden Taq-Man® MicroRNA Array Cards Pool A beziehungsweise Pool B (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit 6 µl des Megaplex™ RT Produkts des jeweiligen A oder B Pools, 450 µl des TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG und 444 µl Nuklease freien Wassers nach Durchmischen beladen. Anschließend wurden befüllte Karten zweimal eine Minute bei 1200 rpm zentrifugiert, mit dem Micro Fluid Card Sealer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verschlossen und nach Standardbedingungen (2 min bei 50°C; 10 min bei 94,5°C; 40 Zyklen: 30 sec bei 97°C; 1 min 59,7°C) auf dem ABI PRISM® 7900 HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vermessen.

2.2.4 Clusteranalyse

In der Clusteranalyse wurden die microRNA Expressionsdaten für einen besseren Überblick so in Gruppen zusammengefasst, dass die microRNAs in einer Gruppe untereinander eine möglichst ähnliche Expression und zwischen zwei Gruppen eine möglichst unterschiedliche Expression aufwiesen. Für diese Analyse wurde die Software Cluster 3.0 (64) verwendet mit der die *average linkage* Methode als Algorithmus und der Rangkorrelation nach Spearman als Maß für die Ähnlichkeit verwendet. Die Clusteranalyse basierte auf den mittels z-Transformation (65) standardisierten Expressionswerten der microRNAs. Zur Visualisierung der Ergebnisse der Clusteranalyse wurde die Software Java Treeview Version 1.1.3 (66) verwendet. 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.

2.2.5 In silico microRNA-Zielgen-Vorhersage

Nach der Auswertung des microRNA-Screenings wurden alle erhobenen microRNA

Daten, bei denen in allen Proben ein C_T-Wert gemessen werden konnte, für weitere Untersuchungen ausgewählt. Um mögliche Interaktionen von den microRNAs mit den 3'-UTRs ihrer Zielgene zu identifizieren, wurden die zuvor erhobenen microRNA Expressionswerte mit den kürzlich veröffentlichten Proteinmengen der Transporter entlang des Gastrointestinaltraktes nach Pearson korreliert (1). Die folgenden Transporterproteine fanden bei dieser Analyse Berücksichtigung: ABCB1, ABCC2, ABCC3, ABCG2, OATP2B1, OCT1, OCT3, ASBT und PEPT1. Nur diejenigen microRNA-Transporter-Paare, die eine signifikant ($p < 0,05$) negative Korrelation aufwiesen, wurden für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen. Zur weiteren Einengung relevanter microRNA-Interaktionen wurde eine *in-silico* Zielgenvorhersage für alle signifikant negativ korrelierten Paare mit den Softwares TargetScan (Release 7.0 09/2015) (67) und MicroCosm Targets Version 5 (68) durchgeführt.

2.3 Untersuchung der microRNA-Zielgen-Interaktion

Für alle microRNA-Transporter-Paare, bei denen sich eine signifikant negative Korrelation zeigte und gleichzeitig eine Bindung der microRNA an das Zielgen vorhergesagt wurde, wurden zur weiteren Untersuchung und möglichen Bestätigung dieser Interaktion Reporter-Gen-Assays durchgeführt.

2.3.1 Vektorkonstrukte

Zur Transfektion wurden bei GeneCopoeia (Rockville, Maryland, USA) Luciferasevektoren bestellt, in die die 3'-UTR des jeweiligen Zielgens firmenseitig hineinkloniert wurde, wobei alle Konstrukte auf dem Vektor pEZX-MT01 basieren. Dieser kodiert für zwei Luciferasen, wobei eine als Reporter und eine als Kontrolle fungiert (s. 2.3.6 und Tab. 2).

2.3.2 microRNAs/precursor-microRNAs

Alle precursor-microRNAs wurden von Ambion (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) bezogen (siehe Tab. 1).

Tabelle 1 Verwendete Precursor microRNAs und deren Katalognummer

Precursor microRNA	Katalognummer
pre-miR-27a-3p	PM10939
pre-miR-100-5p	PM10188
pre-miR-192-5p	PM10456
pre-miR-193a-3p	PM11123
pre-miR-193b-3p	PM12383
pre-miR-215-3p	PM10874
pre-miR-365a-3p	PM11133
pre-miR-409-3p	PM 12446
pre-miR-766-3p	PM11856
Pre-miR™ Negative Control	AM17110

Tabelle 2 Vektorkonstrukte der Reporter-Gen-Assays zur Evaluation der microRNA-/Transporterproteininteraktion

Zielenvorhersage durchgeführt mit ^aTargetscan7.0 und ^bMicroCosm Targets Version

5

Zielgen	Gene Accession	Name des Vektor-konstrukts	Katalognummer	Vektor	Länge des 3'-UTR-insert	microRNA vorhergesagt 3'-UTR zu binden	Position der microRNA Bindestelle auf dem Konstrukt
ABCB1	NM_000927.3	ABCB1-3'UTR	HmiT013100-MT01	pEZX-MT01	611 bp	hsa-miR-27a-3p ^{a,b}	7753-7784
ABCB1	NM_000927.3	ABCB1-3'UTR	HmiT013100-MT01	pEZX-MT01	611 bp	hsa-miR-409-3p ^{a,b}	7467-7485
ABCC3	NM_003786.2	ABCC3-3'UTR	HmiT067282-MT01	pEZX-MT01	501 bp	hsa-miR-192-5p ^b	7751-7768
ABCC3	NM_003786.2	ABCC3-3'UTR	HmiT067282-MT01	pEZX-MT01	501 bp	hsa-miR-215-3p ^b	7751-7768
ABCG2	NM_001257386.1	ABCG2-3'UTR	HmiT062025-MT01	pEZX-MT01	2091 bp	hsa-miR-100-5p ^b	8073-8094
PEPT1	NM_005073.2	PEPT1-3'UTR	HmiT067281-MT01	pEZX-MT01	921 bp	hsa-miR-27a-3p ^b	7911-7922
PEPT1	NM_005073.2	PEPT1-3'UTR	HmiT067281-MT01	pEZX-MT01	921 bp	hsa-miR-193a-3p ^{a,b}	8214-8236
PEPT1	NM_005073.2	PEPT1-3'UTR	HmiT067281-MT01	pEZX-MT01	921 bp	hsa-miR-193b-3p ^{a,b}	8214-8236
PEPT1	NM_005073.2	PEPT1-3'UTR	HmiT067281-MT01	pEZX-MT01	921 bp	hsa-miR-365a-3p	8161-8183
PEPT1	NM_005073.2	PEPT1-3'UTR	HmiT067281-MT01	pEZX-MT01	921 bp	hsa-miR-766-3p ^b	7552-7575

2.3.3 Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur fanden an einer sterilen Arbeitsbank (HeraSafe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit HepG2-Zellen (DMSZ, Braunschweig, Deutschland) statt. Im Brutschrank wurden die Zellen bei einer Lufttemperatur von 37°C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5% geführt. HepG2-Zellen sind adhärente, hepatozelluläre Karzinomzellen eines 15-jährigen kaukasischen Jugendlichen. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 Medium von GE Healthcare (PAA Laboratories, Pasching, Austria) mit dem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FBS Superior, Biochrome, Berlin, Deutschland) und 1% Penicillin / Streptomycin (Gibco by lifetechnologies, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Der Mediumwechsel fand mit auf 37°C aufgewärmtem Medium und im Rhythmus von 2-2-3 Tagen statt. Die kryokonservierten HepG2-Zellen wurden zum Auftauen zügig in einem 37°C warmem Wasserbad erhitzt, nach einer Minute in ein mit 5 ml vorgewärmtem Medium gefüllten Falcon überführt und für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 13 ml frischen Mediums gelöst und anschließend in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Das Passagieren der Zellen erfolgte spätestens bei einer Konfluenz von 70%, was je nach Aussaat 5 bis 7 Tagen entsprach. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen kurz mit 1 x PBS (Gibco) gespült und anschließend nach Hinzugabe von 3 ml Accutase (PAA Laboratories) für 15 Minuten inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 7 ml frischem Medium mehrfach vorsichtig gespült, um noch anhaftende Zellen zu lösen und zusammenhängende Zellen zu vereinzeln. Je nach Dichte der Zellsuspension wurden 0,5 bis 0,8 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 13 ml Medium versetzt.

2.3.4 Kryokonservierung

Die Zellen wurden zunächst wie unter 2.3.3 beschrieben von der Zellkulturflasche gelöst, für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, in 1 ml frischem Medium, dem im Volumenverhältnis 10% DMSO hinzugefügt wurde, resuspendiert und in ein Einfrierröhrchen (Sarstedt) überführt. Dieses wurde zunächst für 24 Stunden bei -80°C in einem Einfriercontainer gelagert, um den Vorgang des Einfrierens zu verlangsamen, ehe sie nach Entnahme ohne Container bei -80°C gelagert wurden.

2.3.5 Transiente Transfektion

Um den vorhergesagten Einfluss der ermittelten microRNAs auf die Zielgene bestätigen zu können, mussten die kultivierten HepG2-Zellen mit den beschriebenen Vektorkonstrukten transient transfiziert werden. Hierfür wurden die Zellen wie unter 2.3.3 beschrieben von der Zellkulturflasche gelöst und 20 µl dieser Suspension in der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde daraufhin mit RPMI 1640 Medium versetzt, bis die Konzentration 120.000 Zellen pro Milliliter entsprach. Als Vorbereitung auf die Transfektion wurde jedes Well einer 96-Well-Platte (Tissue Culture Plate 96 well, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit dem jeweiligen Vektorkonstrukt in einer Konzentration von 67,5 ng pro Well, Opti-MEM I Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) und 10 nM der jeweiligen precursor-microRNA befüllt. Im Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie in Kiel ist dieses Verfahren für Konzentrationen von 1 bis 10 nM etabliert. Bei abweichenden Konzentrationen zeigte sich ein abnehmender Effekt, weshalb im Vorfeld 10 nM als Konzentration der precursor-microRNA definiert wurde. Als Transfektionsreagenz wurde siPORT™ NeoFX™ transfection reagent (Ambion) mit Opti-MEM I Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Well wurden 10 µl dieses Reagenz hinzugegeben und erneut eine zehnminütige Inkubationsphase abgewartet. Von der Zellsuspension wurden anschließend 80 µl in jeden Well pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 100 µl ergab. Nach vier Stunden wurde ein wie unter 2.3.3 beschriebener Mediumwechsel vorgenommen. Die Aktivität der Luciferasen wurde 48 Stunden nach der Transfektion bestimmt.

2.3.6 Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Luciferasen sind Enzyme, die die Reaktion von Luciferinen mit Sauerstoff unter der Emission von Licht katalysieren. In dem verwendeten Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, Mannheim, Deutschland) werden zwei unterschiedliche Luciferasen eingesetzt: die Firefly-Luciferase (aus *Photinus pyralis*) in diesem Fall als Reporter und die Renilla-Luciferase (aus *Renilla reniformis*) als Kontrollreporter. In dem verwendeten Vektorkonstrukt liegt die multiple Klonierungsstelle zwischen der für

die Firefly-Luciferase kodierenden Sequenz und der SV40 late Poly(A) Signalsequenz. Die Firefly-Luciferase steht unter Kontrolle eines Simian-Virus 40 Promoters, die Renilla-Luciferase unter Kontrolle eines Cytomegalievirus Promoters. Erstere setzt D-Luciferin mit ATP, Magnesium und Sauerstoff zu oxy-Luciferin, AMP, PP_i und CO₂ unter der Emission von Licht um. Die Renilla-Luciferase decarboxyliert Coelenterazin unter Verbrauch von Sauerstoff und erzeugt somit eine Lichtquelle. Die Lichtintensität wird im Luminometer erfasst und ist proportional zur Menge an vorhandenem Enzym. Bindet nun eine microRNA an die 3'-UTR des Zielgens, so sorgt sie für eine Destabilisierung der mRNA der Firefly-Luciferase während die Renilla-Luciferase als Kontrollreporter hiervon unbeeinflusst bleibt. Es wird eine Diskrepanz im verringerten Signal der Firefly-Luciferase des zu untersuchenden Vektors im Vergleich zum Signal der Firefly-Luciferase des Kontrollvektors deutlich. Die für die Messungen benötigten und im Kit mitgelieferten Reagenzien (Passive Lysis-Buffer, Luciferase Assay Reagent II und Stop&Glo®-Reagent) wurden nach Herstellerangaben angesetzt. Zuerst wurde das Medium von den Zellen abgenommen und mit 30 µl eiskaltem 1 x PBS pro Well gespült, bevor zu jedem Well 20 µl Passiv Lysis-Puffer hinzugegeben wurde. Jede so behandelte Platte wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur geschwenkt bis die Zellen lysiert waren. Dieses Zelllysats wurde anschließend in eine Luminometerplatte überführt (Nunc™ Surface, 96well cell culture plate, white bottom, NUNC, Roskilde, Dänemark). Das Luminometer (Turner Biosystems, Sunnyvale, USA) injiziert mit einem Injektor nun zuerst 50 µl Luciferase Assay Reagent II bevor es 2 Sekunden später die Firefly-Luciferase-Aktivität misst. 10 Sekunden später werden über einen zweiten Injektor 50 µl Stop&Glo®-Reagent appliziert. Hierdurch wird sowohl die zuvor eingeleitete Reaktion der Firefly-Luciferase gestoppt, als auch die Reaktion der Renilla-Luciferase katalysiert, deren Aktivität nach weiteren 10 Sekunden gemessen wird.

Die Datenauswertung erfolgte wie folgt. Zuerst wurde die Aktivität der Firefly-Luciferase durch Division mit der Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert ($X_{\text{norm}} = \text{Firefly} / \text{Renilla}$). Diese Ratio wurde nun gegen den nicht mit einer microRNA sondern mit der Negativen Kontrolle versetzten Wert des gleichen Vektors normalisiert ($X_{\text{norm}^*} = X_{\text{norm, microRNA}} / X_{\text{norm, NC}}$). Auf diese Weise wurde sowohl mit allen mit Ziel-3'-UTR-Sequenzen bestückten Vektorkonstrukten als auch mit dem Leervektor verfahren. Abschließend wurde der Wert des Vektorkonstruktes auf den Wert des Leervektors

normalisiert ($X_{\text{norm}}^{**} = X_{\text{norm}}^{*}[\text{Vektorkonstrukt}] / X_{\text{norm}}^{*}[\text{Leervektor}]$).

Tabelle 3 Primersequenzen der ortsspezifischen Mutagenese

Name	Katalog Nummer	Stelle der 3'UTR-Mutation	Primersequenz
ABCB1 27a MU F	HmiT013100-MT01	7779-7782	TCATCTTGTCCAACTGCCTGTGAATATATCTTCTCTC
ABCB1 27a MU R	HmiT013100-MT01	7779-7782	GAGAGAAGATATATCAGTAGGCAGTTTGGACAAGATGA
ABCB1 409 MU F	HmiT013100-MT01	7480-7483	TGTTTACAGCTTCCTCAGTCAAG
ABCB1 409 MU R	HmiT013100-MT01	7480-7483	AGGAAGCTGTAAACAGATACCTCTT
ABCC3 192 MU F	HmiT067282-MT01	7762-7765	GATCCGCGAGATCCTGAT
ABCC3 192 MU R	HmiT067282-MT01	7762-7765	TTGGCGTTACTATGGGAACAT
PEPT1 193 MU F	HmiT067282-MT01	8231-8234	AGACAGCTCAGGTGAAGGTACTTAATGATTTTTTTGAAG
PEPT1 193 MU R	HmiT067282-MT01	8231-8234	CTTCAAAAAATCATTAAGTACCTTCACCTGAGCTGTCT
PEPT1 27a MU F	HmiT067281-MT01	8295-8310	TTATTTAAGCCACACGTACACACTGTAGCCTAATATTATTAACCCACCCACATT GGTCATCTTCCCTATCACACAAAT
PEPT1 27a MU R	HmiT067281-MT01	8295-8310	ATTTGTGTGATAGGGAAGATGACCAATGTGGGGTGGGTTAATAATATTAGGCTAC AGTGTGTGTACGTGTGGCTTAAATAA

2.4 Mutagenese

Alle microRNA-Zielgen-Paare, die eine signifikante Abnahme der Reporter-Gen-Aktivität im Vergleich zum Leervektor zeigten, wurden für die Mutagenese ausgewählt. In diesem Schritt sollte die genaue Lokalisation der microRNA Bindestelle an die 3'-UTR des Zielgens herausgefunden werden. Das Ziel der *site directed mutagenesis* ist es in der Bindestelle des Zielgens für die jeweilige microRNA (*seed*) einige Basen zu mutieren, wodurch eine Bindung der microRNA nicht mehr möglich ist. Somit unterbleibt eine microRNA bedingte Herunterregulation der mRNA. In dem anschließenden Reporter-Gen-Assay lässt sich dann kein verringertes Reporter-Gen-Signal feststellen. Für eine Mutagenese werden, neben einer Polymerase mit Korrekturleseaktivität und dem jeweiligen Plasmid, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, bei denen die gewünschten Basen mutiert wurden, benötigt. An die erfolgreiche Mutagenese schlossen sich Reporter-Gen-Assays nach dem unter 2.3.4 und 2.3.5 beschriebenen Verfahren an.

2.4.1 Mutagenese der putativen miRNA-Bindungsstellen

Für die Mutation der seed-Regionen der miR-27a-3p in der ABCB1-3'-UTR, miR-27a-3p, miR-193a-3p und miR-193b-3p in der SLC15A1-3'-UTR und miR-192-5p in der ABCC3-3'-UTR wurde das KAPA HiFi PCR Kit (VWR Life Science Competence Center, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Als Endvolumen wurden in jedem Ansatz 25 µl gewählt, wobei alle verwendeten Reagenzien dementsprechend proportional angepasst wurden (Primersequenzen siehe Tabelle 3). Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Als initiale Denaturierung wurde für 3 min eine Temperatur von 95°C gewählt, es folgten 25 Zyklen bei 98°C für 20 sec (Denaturierung), 71°C (miR-27a-3p in ABCB1 und miR-27a-3p in SLC15A1) beziehungsweise 61°C (miR-193a-3p und miR-193b-3p in SLC15A1) und 72°C (miR-192-5p in ABCC3) für 15 sec (Annealing) und die Extension bei 72°C für 8:20 min (ABCB1) beziehungsweise 9 min (SLC15A1) und 8 min (ABCC3). Ein finaler Extensionsschritt unter gleichen Zeit- und Temperaturbedingungen wie der Extensionsschritt schloss sich an.

Das PCR-Produkt wurde für eine Stunde bei 37°C mit *DpnI* (New England BioLabs,

Frankfurt am Main) inkubiert und somit verdaut. Dieses Restriktionsenzym ist spezifisch für methylierte DNA, wie sie zum Beispiel von *E. coli* synthetisiert wird, nicht aber für unmethylierte DNA, wie sie bei *in-vitro* Synthese wie der PCR entsteht. Somit wird die bei der PCR eingesetzte Template-DNA verdaut, während das PCR-Produkt, die mutierte DNA, unverändert vorliegt. Dieses wurde nun mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Hierfür wurden 10 µl des PCR-Produkts zusammen mit 2 µl loading dye (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) auf ein 1,5%-iges Agarosegel (1,5% Agarose in 1x TBE-Puffer und 1 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und zusammen mit einem Größenmarker (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) laufen gelassen. Anhand der Größenauftrennung konnte nach Abgleich mit einem Größenmarker die Bande des PCR-Produkts von dNTPs, Primern und anderen Nebenprodukten selektiert und herausgeschnitten werden.

2.4.2 Mutagenese der putativen miR-409-3p Bindungsstelle in der ABCB1-3'-UTR

Für die Mutation der seed-Region der miR-409-3p in ABCB1 wurde das In-Fusion Cloning Kit (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) benutzt (Primersequenz siehe Tabelle 3). Dieses Kit benutzt Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die einander an ihrem 5'-Ende mit 15 Basenpaare überlappen. Nach Linearisierung des Vektors unter Verwendung der Primer rezirkulieren die linearen Konstrukte im Schritt der *In-Fusion Reaktion* unter Bindung der komplementären Stränge am jeweiligen 5'-Ende. Die inverse PCR wurde nach Herstellerprotokoll mit insgesamt 35 Zyklen bei 98°C für 10 sec (Denaturierung), 52°C für 15 sec (Annealing) und 72°C für 45 sec (Elongation) durchgeführt.

Es wurde wie unter 2.3.6.1 ein Verdau mit sich anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Das hieraus gewonnene Produkt wurde mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit nach Herstellerangaben für die Aufreinigung von aus Agarosegel extrahierter DNA purifiziert. Nachdem die Agarose durch Hitze und mechanische Einwirkung aufgelöst wird, wird die im Agarosegel vorhandene DNA unter Anwesenheit eines Hochsalzpuffers an eine Silikonmembran gebunden. Nach einigen Schritten zum Auswaschen anderweitiger Kontaminationen wird die DNA in leicht

alkalischem Niedrigsalzmilieu eluiert. Die Konzentration des aufgereinigten Produkts wurde mit Hilfe eines Photometers (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Zur Rezirkulation des zuvor linearisierten Vektors wurde die In-Fusion Reaktion wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

2.4.3 Hitzeschocktransformation kompetenter *E. coli*

Um das zuvor gewonnene PCR-Produkt zu vervielfältigen, wurde dieses in kompetente *E. coli* transformiert.

Hitzeschocktransformation mit den Vektorkonstrukten aus 2.4.1

Die kompeteten *E. coli* vom Stamm DH5 α (*E. coli*, CCRC 51731, DSMZ, Braunschweig) wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, anschließend mit 50 μ l TCM (Tris HCl, CaCl₂, MgCl₂ – je 100 mM bei pH = 7,5) und 2-10 μ g Plasmid versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Es wurde nun ein Hitzeschock von 30 sec in einem Wasserbad von 42°C durchgeführt. Es folgte eine Zugabe von 400 μ l LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl (pH 7,2)) und eine erneute Inkubation von 90 min bei 37°C und 350 rpm. Dieser Ansatz wurde auf Kanamycin-haltigen (50 μ g/ml, Kanamycin, Natrimsalz, Sigma) Agarplatten (3,5% LB Agar, Sigma, in LB-Medium) ausplattiert und über Nacht auf dem Kopf liegend in einem Brutschrank bei 37°C gelagert. Aufgrund der dem PCR-Produkt inerten Kanamycinresistenz können sich in Kanamycin-haltiger Umgebung nur solche Bakterien vermehren, bei denen die Hitzeschocktransformation erfolgreich war.

Hitzeschocktransformation mit den Vektorkonstrukten aus 2.4.2

Das in 2.4.2 erhaltene Produkt wurde in einen kompetentem HST08 *E. coli* Stamm (Stellar™ Competent Cells, Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) transformiert. Hierfür wurden die Zellen vorsichtig auf Eis aufgetaut, 5 ng des Vektorkonstrukts hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der folgende Hitzeschock wurde in einem Wasserbad bei 42°C für eine Dauer von 60 sec durchgeführt, woraufhin die Zellen für 2 Minuten auf Eis zwischengelagert wurden. 500 μ l zuvor erwärmtes SOC-Medium (Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) wurden hinzugegeben und dieses Gemisch für 1 Stunde bei 300 rpm

und 37°C geschüttelt. Die Ausplattierung erfolgte wie beschrieben.

2.4.4 Aufreinigung der Plasmid DNA

Gewachsene Kolonien wurden in Flüssigkulturen übertragen. Zur Aufreinigung der Plasmide wurden je nach Größe der jeweiligen Flüssigkultur das QIAGEN Plasmid Mini Kit oder das QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Funktionsweise beider Kits basiert auf einer Lyse in alkalischem Medium. Nach Zentrifugieren der Bakterien wurden diese in einem mit RNase versetzten TE-Puffer resuspendiert. Das anschließend hinzugegebene SDS zerstört die Zellmembran während NaOH die DNA denaturieren lässt. Durch die Applikation von Kaliumacetat (3 M) wurden Hochsalzbedingungen geschaffen und die Plasmid-DNA renaturiert. Die hohe Salzkonzentration lässt die denaturierten Proteine, die bakterielle, chromosomale DNA und zelluläre Reste ausfallen. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde an Silikagel-Säulen (QIAGEN Plasmid Mini Kit) beziehungsweise Anionen-Austauscher-Säulen (QIAGEN Plasmid Maxi Kit) adsorbiert. Es folgten mehrere Waschschrte, bevor die Plasmid-DNA im QIAGEN Plasmid Mini Kit mit einem Niedrig-Salz-Puffer (50 mM Tris Cl, pH 8.5) eluiert werden konnte. Bei der Elution an Anionen-Austauscher-Säulen wurde ein Hoch-Salz-Puffer benutzt, sodass die Plasmid-DNA erst nach Fällung mit Isopropanol erschlossen wurde.

2.4.5 Sequenzierung

Alle Plasmide wurden mittels Ketten-Abbruch Verfahren nach Sanger (69) beim *Institute of Clinical Molecular Biology* in Kiel mit den Sequenzierprimern für den pEZX-Vektor kontrollsequenziert.

2.5 Proteinisolation und Quantifizierung

Die in diesem Absatz beschriebene Gewebeaufbereitung wurde in Greifswald unter der Aufsicht von Prof. Stefan Oswald durchgeführt. Die Proteinisolation wurde mit dem ProteoExtract® Native Membrane Protein Extraction Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden 40-50 mg jeder

Gewebeprobe geschreddert, in 1,6 ml Zell lysierendem Puffer (5 µl/ml Protease Inhibitor Gemisch) gelöst, mit einem Dounce Gewebehomogenisierer homogenisiert (10 Schläge auf Eis) und anschließend für 15 Minuten bei 4°C leicht geschüttelt. Um die Proteine zu gewinnen, wurde die Suspension für 15 min bei 4°C mit 16.000 g zentrifugiert, die im Überstand befindlichen cytosolischen Proteine verworfen und die verbliebenen Gewebepellets in 500 µl Extraktionspuffer II (5 µl/ml Protease Inhibitor) zusammen mit 10 µl ProteaseMAX™ aufgenommen. Es folgte eine Inkubationszeit von 60 min bei 4°C und leichtem Schütteln, bevor die Suspension erneut für 15 min bei 4°C mit 16.000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand mit den Plasmamembranprotein wurde abgetragen und bei -80°C gelagert.

Zur Quantifizierung der Transporterproteinmenge der physiologischen Biopsate wurde das Verfahren der Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie mit weiteren, direkt angeschlossenen Schritten der Massenspektrometrie (kurz: LC-MS/MS) verwendet. Dies wurde in Greifswald von Prof. Stefan Oswald an einem API4000 Triple-Quadrupole Massenspektrometer (AB Sciex) gemessen, gekoppelt an ein Shimadzu LC (SLC-10A VP) System (Shimadzu, Wood Dale, IL, USA) und ein HTS PAL LEAP Autosampler (LEAP Technologies, Carrboro, NC, USA). Als Methode zur Ionisierung wurde die Electrospray-Ionisation von Turbolon® verwendet. Zur Analyse der gewonnenen Daten wurde die Analyst 1.5 Software (AB Sciex) mit Verwendung der internen Standardmethode und des Peakflächenverhältnisses benutzt (70).

2.6 Statistik

Die microRNA-Expression der unterschiedlichen Gewebe wurde mittels Mann-Whitney U-Test und der Benjamini-Hochberg-Prozedur (71) mit dem Programm R/Bioconductor (72,73) untersucht. Unterschiede in der Reporter-Gen-Aktivität wurden mithilfe des Mann-Whitney U-Tests und ANOVA plus Post-Hoc-Dunnett-Test für additive Effekte mit Prism GraphPad Version 3.4 (GraphPad Software, San Diego, California, USA) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Genomweite Charakterisierung des microRNA-Profiles

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Beschreibung möglicher Interaktionen zwischen microRNAs und Transporterproteinen in Abhängigkeit zur Lokalisation im Gastrointestinaltrakt unter physiologischen Bedingungen. Um dieses Zusammenspiel beschreiben und untersuchen zu können, wurde zunächst eine Messung der microRNA-Expression in verschiedenen Abschnitten entlang des Darmes durchgeführt. Hierfür wurden jedem der sechs Spender sechs Gewebeproben entlang des Darmes an vergleichbaren Positionen im Intestinum entnommen. Von den mittels Taq-Man® MicroRNA Array Cards Pool A und B gemessenen Expressionswerten wurden jene microRNAs eingeschlossen, die in allen 36 Proben einen messbaren C_T-Wert aufwiesen. Es verblieben so von ursprünglich 754 untersuchten microRNAs noch 248, die zur weiteren Untersuchung herangezogen werden konnten. Ihr Expressionsmuster ist nach Geweben aufgeteilt in einer *Cluster-Heatmap* (Abb. 5) dargestellt. Während bei Analyse der Verteilung einzelner microRNAs über benachbarte Gewebe nur graduelle, nicht signifikante Unterschiede auszumachen waren, konnte für eine Vielzahl von microRNAs eine im Dickdarm im Vergleich zum Dünndarm erhöhte Expression beobachtet werden. Den *fold-change* betreffend, konnte für die microRNAs miR-31-3p (83-fach), miR-31-5p (39-fach), miR-215-5p (13-fach), miR-194-5p (7-fach) und miR-192-5p (4-fach) eine in Dünndarmbiopsien signifikant (p-Wert < 0,05) größere Expression beschrieben werden. MicroRNA miR-10b-3p zeigte ein konträres Expressionsmuster mit einer 23-fach niedrigeren Expression im Dünndarm.

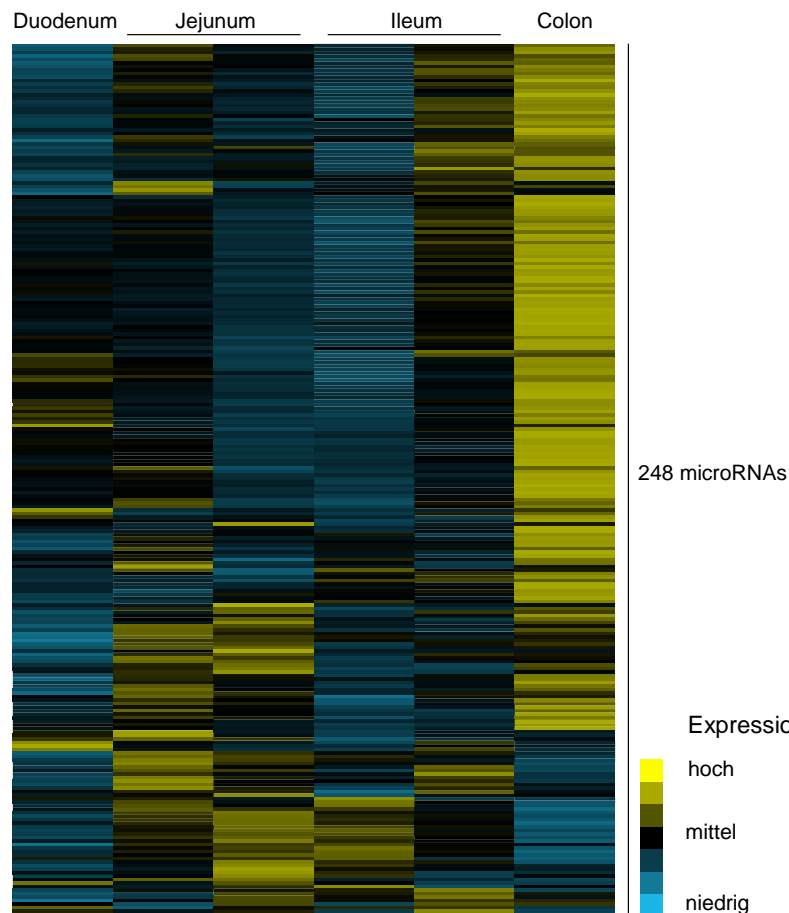


Abbildung 5: microRNA Expressionsprofile entlang der Darmsegmente

Die Clusteranalyse der microRNA-Expressionen basiert auf normalisierten z-transformierten Expressionswerten 248 detektierten microRNAs. Blau steht für ein niedriges, schwarz für ein mittleres und gelb für ein hohes Expressionsniveau.

3.2 Identifikation möglicher microRNA/Transporterprotein-Interaktionen

Um mögliche microRNA/Transporterprotein-Interaktionen zu identifizieren wurden die Expressionsniveaus aller 248 microRNAs mit den von *Drozdik et al.* (1) publizierten Daten für die Proteinexpression relevanter Arzneistofftransporter nach Pearson korreliert. Als Influxtransporter fanden OATP2B1, OCT1, OCT3, ASBT und PEPT1 Berücksichtigung, als Effluxtransporter ABCB1, ABCC2, ABCC3, ABCG2. Es wurden alle microRNA/Transporterprotein-Paare, die eine negativ-signifikante Korrelation ($p < 0,05$) aufwiesen und somit auf eine Regulation der Proteinexpression durch microRNA induzierte RNA-Interferenz schließen ließen, für die weitere Analyse ausgewählt. Die

Ergebnisse der Korrelation sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Es blieben insgesamt 22 microRNA/Transporterprotein-Paare mit einer negativ-signifikanten Korrelation über. Von diesen wurden für wiederum 9 Paare mittels *in silico* Zielvorhersage (via MicroCosm Targets v.5 beziehungsweise Targetscan 7.0) eine Interaktion vorausgesagt. Es ergaben sich so folgende microRNA/Transporterprotein-Paare (s. Tabelle 4): ABCB1 und miR-27a-3p ($r = -0,21$), ABCB1 und miR-409-3p ($r = -0,40$), ABCC3 und miR-192-5p ($r = -0,52$), ABCC3 und miR-215-3p ($r = -0,63$), ABCG2 und miR-100-5p ($r = -0,44$), SLC15A1 und miR-27a-3p ($r = -0,50$), SLC15A1 und miR-193a-3p ($r = -0,49$), SLC15A1 und miR-193b-3p ($r = -0,53$), SLC15A1 und miR-365a-3p ($r = -0,48$), SLC15A1 und miR-766-3p ($r = -0,48$). Die Transporter ABCC2, OATP2B1, OCT1, OCT3 und ASBT fanden demnach keine weitere Berücksichtigung.

Als mögliche microRNAs mit Interaktionspotential ergaben sich so für ABCB1 die microRNAs miR-27a-3p und miR-409-3p. microRNA-27a-3p zunächst wurde obwohl sie in dieser Studie nicht statistisch signifikant negativ mit der Proteinexpression von ABCB1 korrelierte eingeschlossen, da sie schon häufiger als Regulator für ABCB1 beschrieben wurde (74-77). Weiterhin konnte für ABCC3 eine potentielle Interaktion mit den microRNAs miR-192-5p und miR-215-3p identifiziert werden. Für ABCG2 wurde microRNA-100 und für PEPT1 die microRNAs miR-27a-3p, miR-193a-3p, miR-193b-3p und miR-365-3p als potentielle Interaktionspartner gefunden.

Gleichzeitig konnten microRNAs mit signifikant negativer Korrelation ausgemacht werden, für die jedoch keine Zielgenvorhersage gefunden werden konnte. Sie wurden aus diesem Grund von dem weiteren Procedere ausgeschlossen.

Tabelle 4: microRNAs und Transporterproteine mit Pearson's Korrelationskoeffizient

Dargestellt sind microRNAs und Transporterproteine mit Pearsons's Korrelationskoeffizient, * p-Wert $\leq 0,05$, ** p-Wert $\leq 0,01$, n.s. = nicht signifikant, hinterlegte Zellen bedeuten eine signifikant negative Korrelation, bei grau hinterlegten Zellen konnte zusätzlich eine positive Zielenvorhersage mit TargetScan (Version 7.0 09/2015) (67) und MicroCosm Targets Version 5 (68) durchgeführt werden

	ABCB1 (P-gp)	ABCC2 (MRP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCG2 (BCRP1)	SLC15A1 (PEPT1)	SLCO2B1 (OATP2B1)	SLC22A1 (OCT1)	SLC22A3 (OCT3)	SLC10A2 (ASBT)
miR-27a-3p	-0,21	n.s.	n.s.	-0,370*	-0,50**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
miR-100-5p	n.s.	n.s.	n.s.	-0,44**	-0,48**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
miR-192-5p	n.s.	n.s.	-0,52**	n.s.	-0,48**	-0,40*	n.s.	-0,41*	n.s.
miR-193a-3p	n.s.	n.s.	n.s.	-0,37*	-0,49**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
miR-193b-3p	n.s.	n.s.	n.s.	-0,35*	-0,53**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
miR-215-3p	n.s.	n.s.	-0,63**	n.s.	-0,55**	-0,41*	n.s.	-0,46**	n.s.
miR-365-3p	n.s.	n.s.	n.s.	-0,40*	-0,48**	-0,41*	n.s.	-0,46**	n.s.
miR-409-3p	-0,40*	n.s.	n.s.	-0,48**	-0,44**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
miR-766-3p	-0,40*	n.s.	n.s.	-0,47**	-0,48**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Die zuvor mittels Korrelationsanalyse und Zielenvorhersage gefundenen microRNA/Transporterprotein-Paare sollten hinsichtlich ihrer Interaktion weiter untersucht werden. Hierfür wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt.

3.2.1 ABCC3

Es konnten zwei microRNAs identifiziert werden, die mit den Einschlusskriterien für die Untersuchung durch Reporter-Gen-Assays übereinstimmten. Für microRNA-192-5p ($r = -0,52$, $p < 0,01$) konnte eine Interaktion mit ABCC3 im Luciferase-Assay bestätigt werden. Sie sorgte für eine Herabregulation des emittierten Lichtsignals im Vergleich zum leeren pEZX-MT01-Kontrollvektor um 30% ($p < 0,001$). Dieser Effekt konnte durch Mutation der *seed-Region* aufgehoben werden (siehe Abbildung 6). Für die ebenfalls untersuchte microRNA-215-3p ($r = -0,63$, $p < 0,01$) konnte keine signifikante Regulation nachgewiesen werden (Abb. 7).

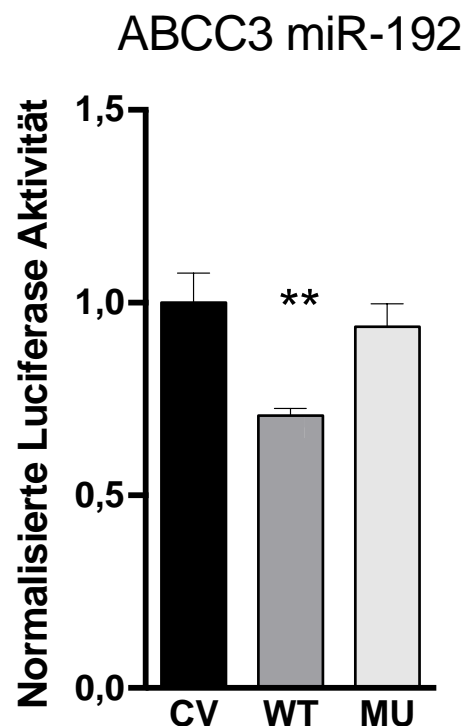


Abbildung 6: Reporter-Gen-Aktivität bei Interaktion der microRNA miR-192-5p [10 nM] mit der ABCC3 3'-UTR. Kontrollvektor (CV). Wildtyp (WT). Wildtyp mit

Mutation der seed-Region (MU). ** entspricht einem p-Wert $\leq 0,01$ im Mann-Whitney-U-Test.

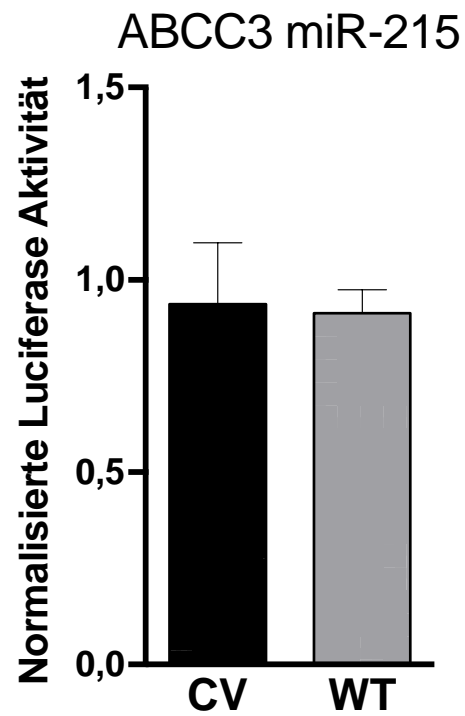


Abbildung 7: Reporter-Gen-Aktivität bei Interaktion der microRNA miR-215-3p [10 nM] mit der ABCC3 3'-UTR. Kontrollvektor (CV). Wildtyp (WT).

3.2.2 ABCB1

Für den Effluxtransporter ABCB1 wurden Reporter-Gen-Assays mit zwei microRNAs durchgeführt. microRNA-27a-3p wurde trotz nicht signifikanter Korrelation im Array-Ansatz ($r = -0,21$, $p > 0,05$) eingeschlossen (siehe 3.2). Hier könnte die Interaktion im Individualassay bestätigt werden konnte (Reduktion der normalisierten Luciferase-Gen-Aktivität um 22%; $p < 0,001$). Darüber hinaus konnte die ABCB1 3'-UTR als Ziel der microRNA-409-3p ($R = -0,40$, $p < 0,05$) identifiziert werden. Diese reduzierte das Signal um 38% ($p < 0,001$). Beide Interaktionen konnte durch Mutation der seed-Region in ihrer Wirkung aufgehoben werden (Abb. 8).

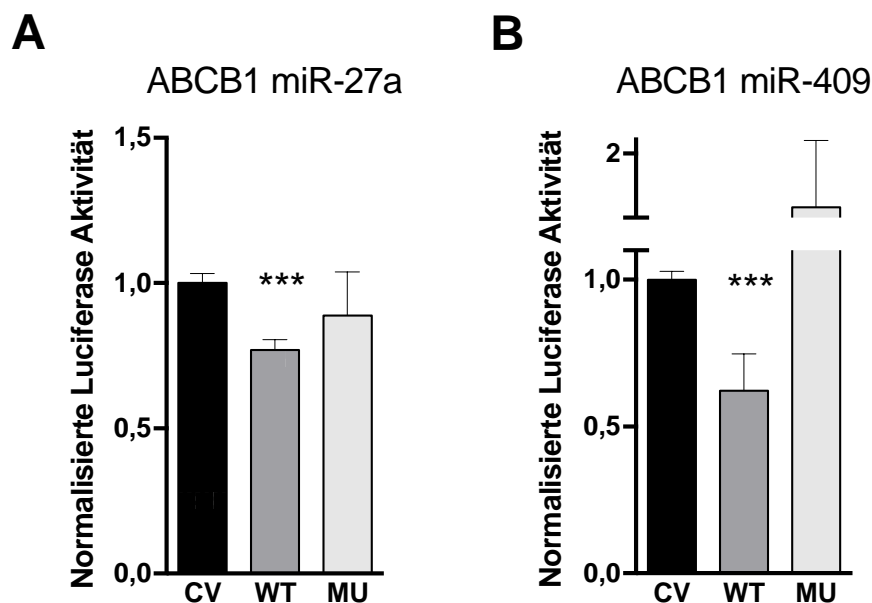


Abbildung 8: Reporter-Gen-Aktivität bei Interaktion der microRNAs miR-27a-3p und miR-409-3p [je 10 nM] mit der ABCB1 3'-UTR. Kontrollvektor (CV). Wildtyp (WT). Wildtyp mit Mutation der seed-Region (MU). *** entspricht einem p-Wert $\leq 0,001$ im Mann-Whitney-U-Test.

3.2.3 ABCG2

Für den Effluxtransporter ABCG2 wurde nur microRNA miR-100-5p ($r = -0,44$, $p < 0,01$) untersucht. Es zeigte sich kein Effekt auf die Luciferase-Expression des mit der microRNA cotransfizierten Vektors im Vergleich zum leeren Kontrollvektor (Abbildung 9).

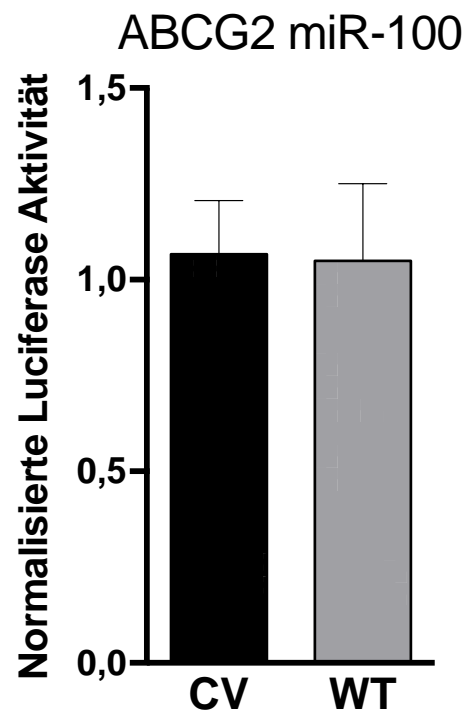


Abbildung 9: Reporter-Gen-Aktivität bei Interaktion der microRNA miR-100-5p [10 nM] mit der ABCG2 3'-UTR. Kontrollvektor (CV). Wildtyp (WT).

3.2.4 PEPT1

Für den einzigen im Luciferase-Reporter-Gen-Assay untersuchten Transporter aus der SLC-Familie konnten fünf microRNAs identifiziert werden, die sowohl eine Zielgenvorhersage für eine Bindung an der 3'-UTR von PEPT1 als auch eine signifikant-negative Korrelation aufwiesen. Hierzu zählten die microRNA-27a-3p ($r = -0,50$, $p < 0,01$) microRNA-193a-3p ($r = -0,49$, $p < 0,01$), microRNA-193b-3p ($r = -0,53$, $p < 0,01$), microRNA-365-3p ($r = -0,48$, $p < 0,01$) und die microRNA-766-3p ($r = -0,48$, $p < 0,01$). microRNA-27a-3p reduzierte das emittierte Lichtsignal um 20% ($p < 0,001$). Die schon in der Literatur beschriebene Interaktion der microRNA-193a-3p mit der 3'-UTR von PEPT1 (78) konnte bei einer Minderung der Luciferase-Expression um 65% ($p < 0,05$) bestätigt werden. Die der microRNA-193a-3p sequentiell sehr ähnliche microRNA-193b-3p konnte in der Interaktion mit PEPT1 aufgrund einer Repression der normalisierten Luciferase-Reporter-Gen-Aktivität um 49% ($p < 0,01$) ebenfalls bestätigt werden. Für diese drei microRNAs konnte die Reduktion der Gen-Aktivität durch eine gezielte, ortsspezifische Mutagenese der *seed-Region* aufgehoben werden (Abb. 10).

Sowohl für die microRNA-365-3p als auch für die microRNA-766-3p zeigte sich kein Einfluss auf die Reporter-Gen-Aktivität im Vergleich zum leeren Kontrollvektor (siehe Abb. 11).

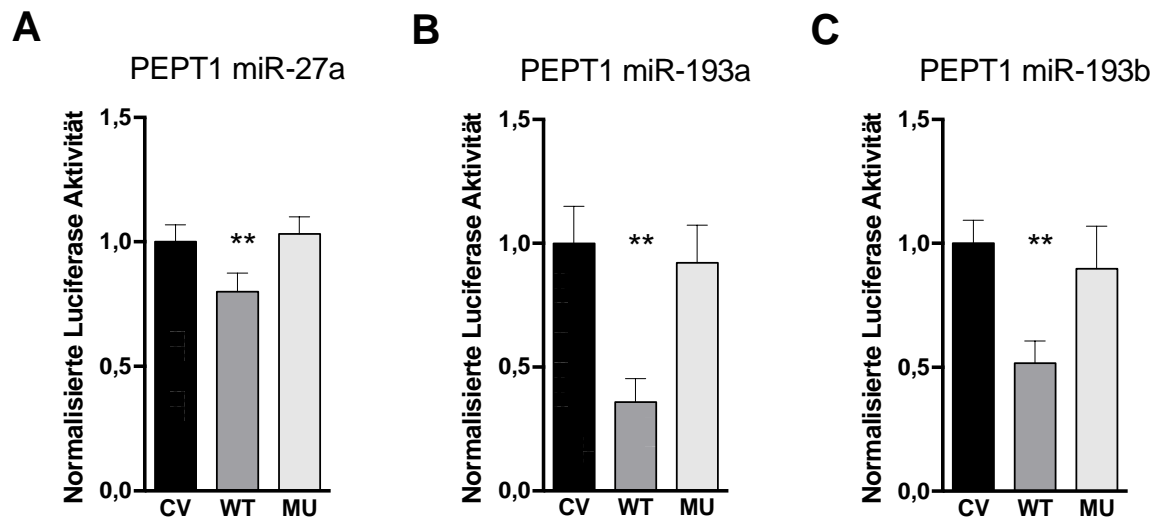


Abbildung 10: Reporter-Gen-Aktivität bei Interaktion der microRNAs miR-27a-3p, miR-193a-3p und miR-193b-3p [je 10 nM] mit der PEPT1 3'-UTR. Kontrollvektor (CV). Wildtyp (WT). Wildtyp mit Mutation der seed-Region (MU). ** entspricht einem p-Wert $\leq 0,01$ im Mann-Whitney-U-Test.

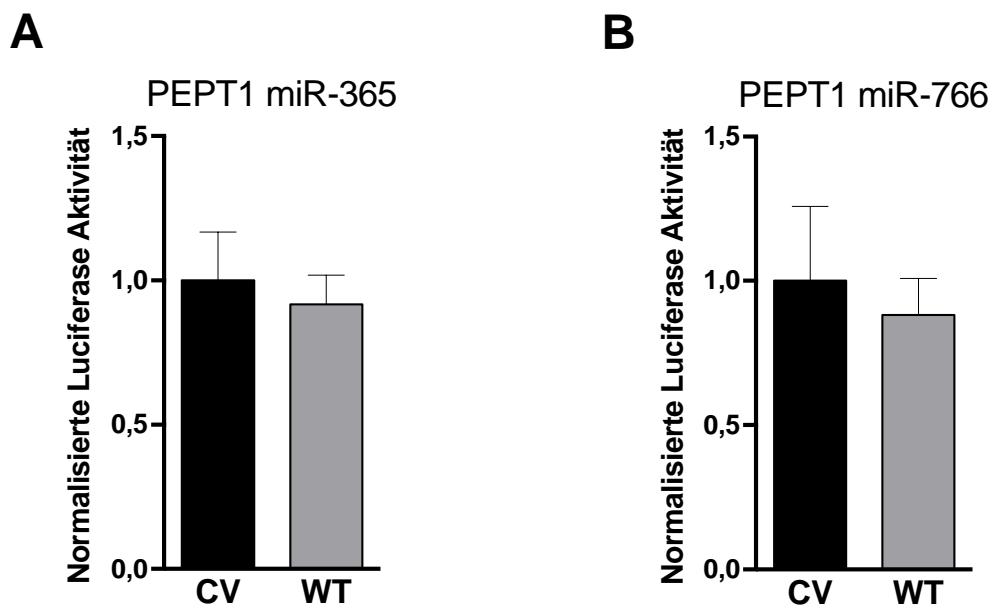


Abbildung 11: Reporter-Gen-Aktivität bei Interaktion der microRNAs miR-766-3p und miR-365-3p [10 nM] mit der PEPT1 3'-UTR. Kontrollvektor (CV). Wildtyp (WT).

3.2.5 Additive Effekte beteiligter microRNAs für ABCB1 und PEPT1

Da bekannt ist, dass mehrere microRNAs an die 3'-UTR eines Genes binden können und somit additive Effekte aufweisen können (31), wurde auch möglichen synergistischen, negativ regulatorischen Effekten nachgegangen. Voraussetzung hierfür waren mehrere microRNAs, bei denen eine Interaktion mit der 3'-UTR der gleichen Transporter-mRNA nachgewiesen wurde. Dies trifft auf den Effluxtransporter ABCB1 und die microRNA-27a-3p beziehungsweise microRNA-409-3p genauso zu wie auf den Aufnahmetransporter PEPT1 und die microRNA-27a-3p, microRNA-193a und microRNA-193b-3p.

Es wurden, in sonst gleicher Vorgehensweise wie bei den zuvor durchgeführten Reporter-Gen-Assays, nun jeweils die entsprechenden microRNAs zusammen mit dem gleichen Vektor kotransfiziert.

ABCB1 und microRNA-27a-3p und microRNA-409-3p

Obgleich sich eine signifikante Verminderung des Signals um 22% ($p < 0,001$) zeigte, konnte kein additiver Effekt der Kotransfektion von microRNA-27a-3p und microRNA-409-3p auf die Expression von ABCB1 nachgewiesen werden, da die microRNAs schon einzeln eine Reduktion des Signals um 22% (miR-27a-3p, $p < 0,001$) und 38% (miR-409-3p, $p < 0,001$) bewirkten.

PEPT1 und microRNA-27a-3p, microRNA-193a-3p und microRNA-193b-3p

Es wurden die möglichen Kombinationen der microRNAs kotransfiziert. Während alle vier Zusammenstellungen die Reporter-Gen-Aktivität signifikant senken konnten (siehe Tabelle 5), so erzielte nur die Kombination aus microRNA-27a-3p und microRNA-193b-3p eine stärkere Reduktion als die einzelnen microRNAs (siehe Abbildung 12). Die Senkung der Luciferase-Aktivität um 57% ($p < 0,001$) liegt deutlich über dem Effekt bei alleiniger Transfektion der microRNA-27a-3p (20% Reduktion) beziehungsweise microRNA-193b-3p (49% Reduktion). Es lässt sich somit nur für diese beiden microRNAs ein synergistischer Effekt auf die Reporter-Gen-Aktivität beschreiben.

Tabelle 5 Einfluss der kombinierten microRNA Applikation in Reporter-Gen-Assays auf die Reporter-Gen-Aktivität auf die 3'-UTR von PEPT1

Kombination	Senkung der normalisierten RGA	p-Wert
miR-27a-3p+ miR-193a	50%	p<0,001
miR-27a-3p+ miR-193b	57%	p<0,001
miR-193a-3p + miR-193b	43%	p<0,001
miR-27a-3p+ miR-193a-3p + miR-193b	52%	p<0,001

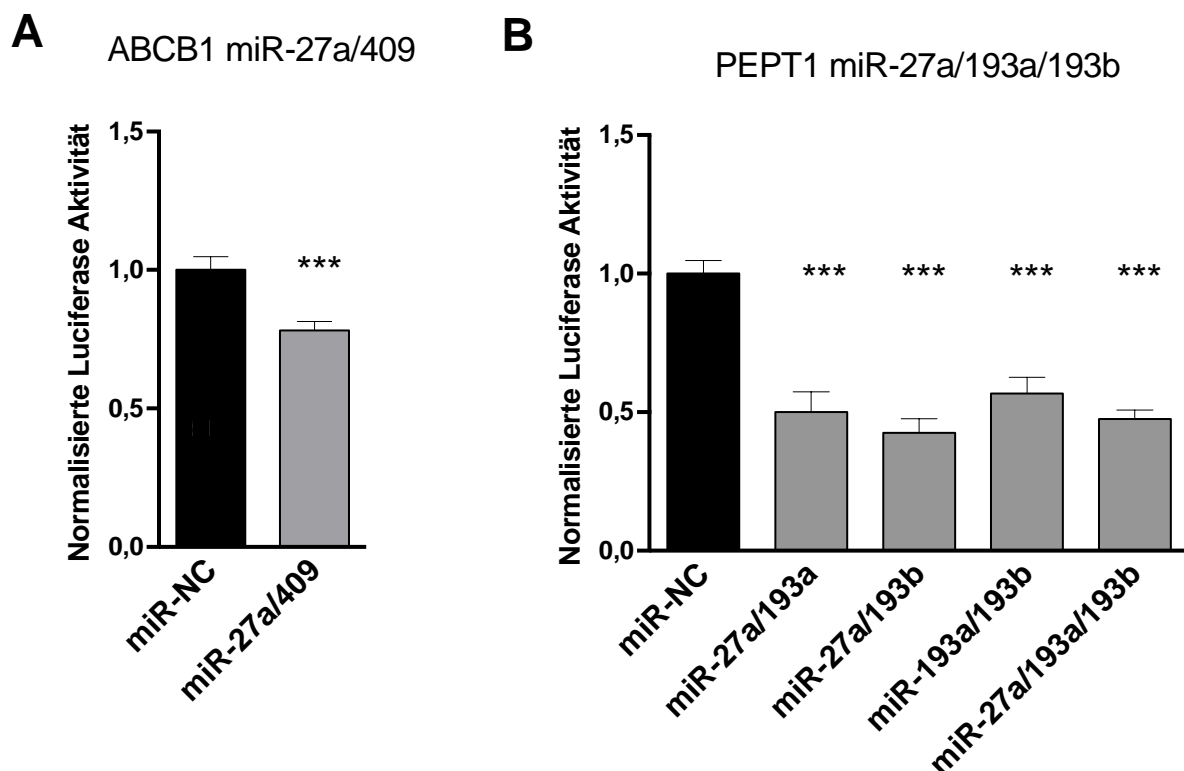


Abbildung 12: Reporter-Gen-Assays zur Untersuchung synergistischer Effekte.

A) Kotransfektion der ABCB1 3'-UTR Zielensequenz mit den microRNAs miR-27a-3p und miR-409-3p und Darstellung des synergistischen Effekts auf die Reporter-Gen-Aktivität (grauer Balken) im Vergleich zur Kontrolle (CV, schwarzer Balken).

B) Kotransfektion der PEPT1 3'-UTR Zielensequenz und unterschiedlicher microRNA-Kombinationen mit je 10 nM und Darstellung des synergistischen Effekts auf die Reporter-Gen-Aktivität (graue Balken) im Vergleich zur Reporter-Gen-Aktivität der Kontrolle (CV, schwarzer Balken). *** entspricht einem p-Wert $\leq 0,001$.

3.2.6 Zusammenfassung der Reporter-Gen-Assay Ergebnisse

Nach der Durchführung aller Reporter-Gen-Assays für alle eingeschlossenen microRNAs und Transporterproteine folgt eine kurze Darstellung der validierten und nicht validierten Interaktionen (Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammenfassung der in Reporter-Gen-Assays untersuchten microRNA-/Transporterprotein-Interaktionen

	Transporter			
	ABCB1	ABCC3	ABCG2	PEPT1
Interaktion in vitro nachgewiesen	<i>microRNA-27a</i>	<i>microRNA-192</i>		<i>microRNA-27a</i>
	<i>microRNA-409</i>			<i>microRNA-193a</i>
				<i>microRNA-193b</i>
Interaktion in vitro nicht nachgewiesen		<i>microRNA-409</i>	<i>microRNA-100</i>	<i>microRNA-365</i>
				<i>microRNA-766</i>

4 Diskussion

In dieser Arbeit konnte der regulatorische Einfluss unterschiedlicher microRNAs auf die Expression der Transporterproteine PEPT1 (miR-27a-3p, miR-193-3p und miR-193b-3p), ABCB1 (miR-27a-3p und miR-409-3p) und ABCC3 (miR-192-5p) in nicht krankhaft verändertem Gewebe menschlicher Probanden nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13). Außerdem konnte mit der miR-192-5p eine microRNA gefunden werden, die über posttranskriptionale Modifikation eine Erklärung für die von Drozdik *et al.* beobachtete Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinexpression des Transporterproteins ABCC3 bietet (1).

Als Grundlage für die Beantwortung dieser beiden Kernfragen der Arbeit wurde zuvor eine systematische Analyse der regionalen Expressionsmuster im menschlichen Gastrointestinaltrakt an physiologischen Proben durchgeführt. Die anfangs gesteckten Ziele konnten vollauf erreicht und die gestellten Fragen beantwortet werden.

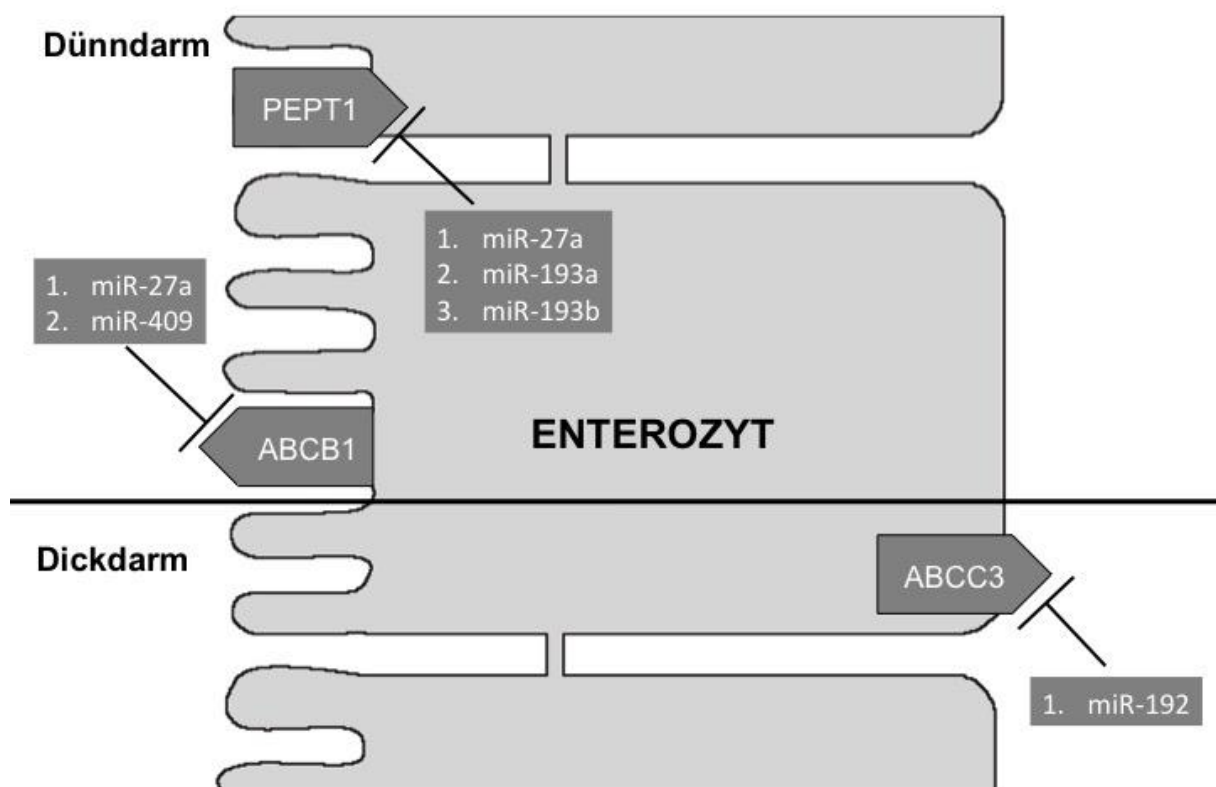


Abbildung 13 Zusammenfassung der microRNA/Transporterprotein-Interaktion

Dargestellt ist in der oberen Hälfte der Abbildung exemplarisch ein Enterozyt im Dünndarm mit den luminalen Transporter PEPT1 und ABCB1 und regulatorischen miRs. Im unteren Teil der Abbildung ist exemplarisch ein Enterozyt im Dickdarm mit dem basolateralen Effluxtransporter ABCC3 und einer regulatorischen miR dargestellt.

Der Einfluss unterschiedlicher microRNAs auf die Expression von Transporterproteinen war schon vor Erstellung dieser Arbeit weithin bekannt und wird seit knapp zehn Jahren intensiv untersucht. Zhu *et al.* konnten 2008 das erste Mal einen Zusammenhang zwischen zwei microRNAs und dem Transporterprotein ABCB1 feststellen (76). Allerdings erfolgte bei Zhu *et al.* und auch bei anderen darauf folgenden Arbeitsgruppen die Erforschung des Zusammenspiels von microRNAs und Transporterproteinen zumeist vor dem Hintergrund pathologischer Prozesse. Vor allem die Wirkung von microRNAs auf die Transporterprotein-vermittelte Chemotherapeutikaresistenz rückte in den Fokus (53,75,79,80). Gleichzeitig begann auch die Erforschung von microRNAs und Transporterproteinen im physiologischen Gewebe, allerdings immer mit Bezug zu einem bestimmten Transporter an einer expliziten Stelle entlang des Darmtraktes (81,82) oder zu einem bestimmten Prozess wie dem Fettstoffwechsel (83,84). Die ersten Zusammenfassungen, die sich dem Gesamtbild der Transporter der ABC- und SLC-Familien und ihrer Regulation durch microRNAs widmeten und versuchten, hierüber einen Überblick zu verschaffen, wurden von Ikemura *et al.* und Haenisch *et al.* im Jahr 2014 vorgelegt (44,85). Gesundes Gewebe, frei von krankhaften Veränderungen, ist für keine dort beschriebene Interaktion die Grundlage gewesen (44). Neben der Tatsache, dass für viele Studien nur Proben aus einem pathologisch-verändertem Magen-Darm-Trakt verwendet wurden, stammten die Biopsate unterschiedlicher Darmsegmente von unterschiedlichen Probanden, sodass nicht die Veränderung der Proteinexpression entlang des Darms eines Individuums bestimmt werden konnte (24-26,86). Aufgrund interindividueller Unterschiede war die Aussagekraft dieser Studien somit begrenzt. Andere Publikationen fokussierten sich auf die Expression eines spezifischen Transporters (87) oder es wurde nur die Transporter-Expression auf mRNA-Ebene gemessen (27,88). Von der mRNA auf die Proteinmenge zu schließen, ist aufgrund posttranskriptionaler Regulationsmechanismen jedoch nur unter Einschränkungen möglich. All diese Faktoren haben dazu geführt, dass es schwierig war, ein kohärentes

Bild über die Verteilung von Transporterproteinen entlang des Darms zu gewinnen. Aufgrund der von Drozdik *et al.* vorgelegten Daten konnte erstmals nicht nur intraindividuell ein Überblick über die Verteilung von Transporterproteinen entlang des Darms gewonnen, sondern auch Unterschiede in deren Expressionen zwischen Dünn- und Dickdarm beobachtet werden (1). Des Weiteren war es so möglich, die beobachtete Verteilung der Transporterproteine mit den Expressionswerten von microRNAs zu korrelieren und in physiologischem Gewebe neue Interaktionen herauszuarbeiten sowie diese mit Studien aus pathologischen Geweben zu vergleichen.

4.1 microRNA-Expressionsmuster entlang des Darms

Bei den gemessenen Expressionsmustern der microRNAs über die unterschiedlichen Darmabschnitte fallen Veränderungen auf. Die Übergänge von Abschnitt zu Abschnitt wirken graduell. Das Expressionsmuster der im Duodenum exprimierten microRNAs stimmt mehr mit dem des oralen als mit dem des aboralen Jejunum überein, genauso wie beide jejunalen Abschnitte in großen Teilen eine Übereinstimmung aufweisen. Der größte Sprung erfolgt bei den aus dem Colon gewonnenen Proben, die sich noch stärker, als die des terminalen Ileums von der Gesamtheit der im Dünndarm ermittelten Expressionsmuster unterscheiden. Dass sich nur für einige wenige microRNAs ein signifikanter Unterschied in der Expression im Dünndarm verglichen mit dem Dickdarm zeigen ließ, liegt sowohl in der geringen Probandenanzahl, als auch in der zu kleinen Menge von Proben der einzelnen Abschnitte begründet. Für die sich entlang des Darms ändernde microRNA-Expression lassen sich mehrere Gründe diskutieren, zuvorderst natürlich der sich von Darmabschnitt zu Darmabschnitt ändernde makro- und mikrohistologische Aufbau, sowie die damit einhergehenden unterschiedlichen Funktionen. Einen weiteren Einfluss auf dieses Verteilungsmuster könnten ortsständige Bakterien der physiologischen Darmflora haben. Mehrere Studien beschreiben die Regulation von Transporterproteinen im Darmepithel durch die Mikroflora des Darms (89,90). Auch Wang *et al.* konnten schon 2014 einen direkten Einfluss des Mikrobioms im Darm auf die Expression von Transporterproteinen nachweisen. Ihnen gelang es allerdings auch aufzuzeigen, dass für diese Änderung der Proteinexpression die Änderung der Expression der microRNA-10b verantwortlich war. Durch den bakteriellen Metaboliten Protocatechusäure reduzierte sich die miR-

10b Expression, was wiederum dazu führte, dass die Expression der Transporter ABCA1 und ABCG1 anstieg (91). Obgleich diese Beobachtung für Makrophagen getätigt wurde, lässt sich das Prinzip auch auf das Epithel des Gastrointestinaltraktes anwenden und liefert somit eine mögliche Erklärung für die ortsspezifischen Unterschiede in der microRNA-Expression. Diese könnten zumindest in Teilen den ortsspezifischen Unterschieden in dem sich stark unterscheidenden intestinalen bakteriellen Besatz folgen (92). Als weiteren Ansatzpunkt lässt sich der Einfluss der Ernährung auf die Expression von microRNAs diskutieren. Dieser ist in zahlreichen Versuchen untersucht und in vielen Veröffentlichungen dargestellt, wobei auch Phytoderivate wie Curcumin, Resveratrol und Isothiocyanate die Expression beeinflussen (93-96). Weitere Veränderungen im Expressionsmuster von microRNAs wurden für auf Zellen einwirkenden Stress oxidativer Genese und durch Bestrahlung oder Etoposid induzierte Doppelstrangbrüche formuliert (97,98). Auch chronischer Alkoholabusus und sportliche Aktivität können auf die microRNA-Expression einwirken (99,100). Inwieweit diese dargestellten möglichen Einflussgrößen tatsächlich auch das zuvor beschriebene Darmabschnitt-abhängige Expressionsmuster der microRNAs beeinflussen, bleibt vorerst offen und bedarf weiterer Abklärung.

4.2 Einfluss von microRNAs auf die Transporterproteinexpression

Das sich zwischen unterschiedlichen Darmsegmenten unterscheidende Expressionsmuster der microRNAs passt zu dem sich ändernden Expressionsmuster der Transporterproteine und somit zu der Annahme, dass die Expression von microRNAs einen Einfluss auf die Expression von Transporterproteine hat. Eine Erklärung für die zwischen Dünn- und Dickdarm beobachteten Unterschiede in der Transporterproteinverteilung stellt ein zu dieser Transporterproteinverteilung inverses Expressionsmuster regulierender microRNAs dar. In Abschnitten mit relativ hoher Proteinmenge wäre die microRNA-Expression dementsprechend gering *et vice versa*.

Auch die von Drozdik *et al.* beobachtete Diskrepanz zwischen mRNA-Expression und Proteinmenge von ABCC3 ist durch die zu ABCC3 inverse Expression der microRNA-192-5p bei im Reporter-Gen-Assay bestätigter Interaktion erklärbar. Die sich in der Korrelationsanalyse ebenfalls negativ-signifikant zur Expression von ABCC3 zeigende microRNA-215-3p wurde im Reporter-Gen-Assay jedoch nicht als interagierend

bestätigt. Der Zusammenhang zwischen microRNA und Protein reicht in diesem Fall über das physiologische Spektrum hinaus. Für beide microRNAs, als auch für ABCC3 wurde eine veränderte Expression im Zusammenhang mit mehreren Karzinomentitäten, unter anderem dem Kolonkarzinom nachgewiesen (101,102). So haben Mohammadi *et al.* eine signifikante Herabregulation der microRNA-192-5p-Expression aufgezeigt (103). In zwei weiteren Publikationen korrelierte die Verminderung der Expression mit einer Zunahme des Karzinomstadiums (104,105). In der Veröffentlichung von Braun *et al.* konnte neben einer Bestätigung dieser Beobachtung auch ein Zusammenhang zwischen der Expression der microRNA-192-5p und der des Tumorsuppressorgens p53 hergestellt werden. Hiernach wirkt p53 induzierend auf die Expression der microRNA-192-5p, die selbst wiederum eine Erhöhung der intrazellulären p21-Konzentration, einem Zellzyklusarrest-Protein, bewirken kann (106). Nach Karaayvaz *et al.* ist die mutmaßliche Tumorsuppressoreigenschaft von microRNA-192-5p von klinischer Relevanz für die Entstehung von Kolonkarzinomen (107). Interessanterweise wurde dies von Braun *et al.* und Karaayvaz *et al.* nicht nur für die microRNA-192-5p sondern auch für die microRNA-215-3p formuliert. Diese korrelierte in dieser Arbeit ebenfalls signifikant negativ mit der Menge von ABCC3 und wies auch eine Zielgenvorhersage für ABCC3 auf, wurde wie schon erwähnt im Reporter-Gen-Assay jedoch nicht als interagierende microRNA bestätigt. Für die signifikant verminderte Expression von microRNA-192-5p im Tumorgewebe könnte es mehrere Erklärungsmöglichkeiten geben. Augenfällig ist der Zusammenhang zwischen einer erniedrigten Expression von p53 im Tumor (108), die wiederum eine niedrigere Expression der microRNA-192-5p zur Folge hat. Des Weiteren liegen mehr als die Hälfte der für microRNAs kodierenden Gene in krebsassoziierten oder fragilen Genloci (109), krebsartige Zellen können durch eine Hypermethylierung von microRNAs deren Funktion verändern, wie an dem Beispiel der microRNA-375 in der Entstehung von Melanomen deutlich wird (110). Ähnliche Hinweise für epigenetische Modifikation von microRNAs liegen für Histonacetylierung und Hypermethylierungen in microRNA-spezifischen Promotorregionen vor (111). Ein weiterer Mechanismus ist der Eingriff in den Entstehungsweg der microRNAs. Chen *et al.* haben unterschiedliche Möglichkeiten dieser Eingriffe, zum Beispiel die durch Lin-28 vermittelte Inaktivierung des Dicer-abhängigen Reifungsschrittes oder die p53 vermittelte Modulation des Drosha-Komplexes, zusammengefasst (112). Kobayashi *et al.* zeigen hierzu widersprüchliche Ergebnisse in der Expression von ABCC3 auf.

Danach ist diese während der Karzinogenese über Einflussnahme des Wnt-Signalwegs vermindert. Die erhöhte Expression von ABCC3 unter Zytostatika-Therapie und die damit verbundene Chemotherapeutika-Resistenz konnte jedoch nicht auf Veränderungen im Wnt-Signalweg zurückgeführt werden (101). Eine mögliche Erklärung für den fehlenden inversen Zusammenhang von microRNA- und Proteinexpression in karzinomatös verändertem Gewebe könnte sein, dass die miRNA-abhängige Kontrolle der Transporter-Protein-Expression im Tumor-Gewebe verloren geht. Tumorzellen könnten durch alternatives Spleißen entstandene verkürzte 3'-UTRs ein Mittel sein, um der microRNA eine Bindung an die mRNA-Zielregion unmöglich zu machen (113). Im Tumorgewebe würde somit nicht immer ein inverses Verhältnis zwischen microRNA und Zielprotein zu beobachten sein. Dies und die bereits oben erwähnten Mechanismen verdeutlichen, dass die Kontrolle der Proteinexpression in Tumorzellen auf mehreren Ebenen dereguliert sein könnte und dass das Phänomen der Chemotherapieresistenz nicht allein durch eine erhöhte, möglicherweise miRNA-vermittelte Protein-Menge von Effluxtransportern bedingt sein muss. Vielmehr handelt es sich bei der Chemotherapieresistenz höchstwahrscheinlich um ein multifaktorielles Geschehen, wobei vorstellbar ist, dass die Dysregulation von microRNAs und Transporterproteinen initial bei der Resistenzentwicklung eine Rolle spielt, im weiteren Verlauf aber andere Signalwege in der Zelle so verändert werden, dass es zu einem verringerten Ansprechen auf Tumorthérapeutika kommt. Die Komplexität der Therapieresistenz wird zusätzlich durch die Tatsache erhöht, dass einzelne miRNAs mehrere Zielgene in Ihrer Expression kontrollieren können und es somit, vielleicht auch zeitversetzt, zur Beeinflussung unterschiedlicher zellulärer Mechanismen kommt, die die Zelle gegenüber Zelltod-induzierenden Einflüssen widerstandsfähiger machen.

Für den Transporter ABCB1 wurde für die microRNA-409-3p eine bis dato unbekannte Interaktion beschrieben und die bekannte Interaktion der microRNA-27a-3p mit ABCB1 bestätigt (74-77,114). MicroRNA-409-3p wird mit mehreren Tumorentitäten in Verbindung gebracht. Während Jossion *et al.* eine Überexpression von miR-409-3p mit Epithelial-Mesenchymaler-Transition, der Entstehung von Prostatakrebs und hierbei auftretenden Knochenmetastasen in Verbindung bringt (115,116), konnten zahlreiche andere Autoren die Entstehung von Krebs bei einer niedrigeren Expression von miR-409-3p beobachten. Herunterregulation von miR-409-3p korreliert mit der Entstehung

von Magenkrebs und assoziierten Metastasen (117), Adenokarzinomen der Lunge (118) und dem Kolonkarzinom (119). Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der miR-409-3p-Expression eine Apoptose-induzierende Tumorsuppressor-Wirkung hat (118-120). Tan *et al.* beschreiben eine von der miR-409-3p-Expression abhängige Oxaliplatinresistenz von Kolonkarzinomzellen. Bei Oxaliplatin-resistenten Zellen zeigte sich eine geringere, bei Oxaliplatin-sensitiven Zellen eine höhere Expression von miR-409-3p, wobei die Chemosensitivität durch Inhibition von Beclin-1 und hierüber vermittelter Autophagie erhöht wurde (119). Eben jene Chemoresistenz gegenüber Oxaliplatin in Kolonkarzinomzellen konnte vor kurzem von Zhou *et al.* über eine Inhibition von ABCB1 durch Überexpression von miR-509 signifikant verringert werden (121). Durch die hier neu aufgezeigte Interaktion zwischen der microRNA-409-3p und ABCB1 ist eine weitere miRNA identifiziert worden, die bei der physiologischen Regulation von ABCB1, möglicherweise aber auch bei der ABCB1-vermittelten Chemotherapieresistenz eine wichtige Rolle spielen könnte. Neue Versuche sollten den möglichen Einfluss einer Überexpression von miR-409-3p auf die ABCB1-Expression, die damit verbundene Chemoresistenz und mögliche Anwendungsmöglichkeiten in Krebszellen untersuchen. Auch die gleichzeitige Wirkung auf Beclin-1 (119) und ABCB1, die beide eine wichtige Rolle in der Entstehung der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika zu spielen scheinen (122,123), bedarf weiterführender Untersuchungen.

Für die Interaktion der microRNA-27a-3p mit ABCB1 finden sich konträre Ergebnisse in der Literatur. Li *et al.* und Zhu *et al.* beschreiben einen positiven Einfluss der microRNA-27a-Expression auf die exprimierte Menge von ABCB1. Die microRNA-27a-3p führe über die Herabregulation mehrerer Transkriptionsfaktoren zu einer erhöhten Expression von ABCB1 sowohl in ovariellen Krebszellen wie auch in einer Zervixkarzinom-Zelllinie (75,76). Diametral hierzu stehen die Ergebnisse von Chen *et al.*, Feng *et al.* und Messingerova *et al.*, die alle ein inverses Verhältnis von microRNA-27a-Expression zu ABCB1-Expression beschreiben. Als Basis dieser Untersuchungen liegen Hepatozelluläre Karzinom- (74) und Leukämiezellen (77,114) zu Grunde. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien erklärbar. Es sind aber zur Klärung dieser unterschiedlichen Regulationsmechanismen weitere Studien notwendig, die die zur Regulation der Proteinexpression führenden Signalwege genauer untersuchen und in

verschiedenen Zelllinien miteinander vergleichen. Eine genauere Kenntniss über diese Prozesse ist vor allem vor dem Hintergrund der durch ABCB1 bedingten Chemotherapeutika Resistenzen von enormer Bedeutung (124). Auch der genaue Einfluss von microRNA-27a-3p auf die ABCB1-Expression im Darm sollte weiter abgeklärt werden. In dieser Arbeit konnte zumindest der negativ regulatorische Einfluss von microRNA-27a-3p auf ABCB1 sowohl in physiologischem Gewebe, als auch in-vitro untermauert werden.

Für den SLC-Transporter PEPT1 wurden die microRNA-27a-3p, microRNA-193a-3p und microRNA-193b-3p als hemmende Effektoren auf die Expression von PEPT1 bestätigt. Der Einfluss von microRNA-193a-3p auf die Regulation von PEPT1 ist schon durch Dai *et al.* beschrieben worden (78). Neben der wichtigen Funktion von PEPT1 für Di- und Tripeptidabsorption, spielt PEPT1 auch eine wichtige Rolle in der Aufnahme von Beta-Laktam-Antibiotika, Antiviralen Medikamenten und *Angiotensin-Converting-Enzyme* Hemmern (125,126). PEPT1 weist im physiologischen Zustand eine hohe Expression im resorptiv aktiven Dünndarm und eine niedrige Expression im Colon auf, die unter pathologischen Bedingungen anzusteigen scheint. So wird PEPT1 bei inflammatorischen Prozessen wie Colitis ulcerosa, Morbus Crohn oder einer Colitis deutlich stärker exprimiert und verstärkt weiterhin die entzündliche Reaktion durch Aufnahme proinflammatorischer bakterieller Stoffwechselprodukte (81,127). Dies ist vor dem Hintergrund des stark bakteriell-besiedelten Milieus im Colon von besonderer Bedeutung. Dai *et al.* konnten durch intracolische Applikation der microRNA-193a-3p bei Mäusen, bei denen eine Colitis induziert wurde, eine Herunterregulation von PEPT1 und gleichzeitig auch eine Besserung klinischer Parameter mit histologisch nachweisbarem Rückgang der Inflammation im Vergleich zur Kontrolle bewirken (78). Diese Erkenntnisse eröffnen der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und anderen inflammatorischen Pathologien ein neues Feld. Im Rahmen der Klistierbehandlung könnte so über eine Applikation der PEPT1 regulierenden microRNAs eine Senkung der Transporterproteinmenge und damit eine Linderung der Beschwerden ermöglicht werden. Hierfür bedarf es allerdings noch weiterer Nachforschung und Bestätigungen vor allem im Tiermodell und in klinischen Studien. Eine Interaktion der in der Korrelationsanalyse negativ-signifikant zur Expression von PEPT1 auffallenden microRNA-365-3p und microRNA-766-3p konnte

im Reporter-Gen-Assay nicht bestätigt werden. Gleiches gilt für die mit ABCG2 negativ korrelierte microRNA-100-5p.

Neben Interaktionen bei denen eine microRNA ein Zielgen beeinflusst, ist es auch möglich, dass mehrere microRNAs mit den gleichen Zielgenen interagieren und einen synergistischen Effekt aufweisen können (128). Hierfür konnten die microRNA-27a-3p und microRNA-409-3p mit ABCB1 als Zielgen ausgemacht werden. Für PEPT1 wurden sowohl die microRNA-27a-3p als auch microRNA-193a-3p und microRNA-193b-3p ermittelt. Im Reporter-Gen-Assay konnte nur für die Kombination aus microRNA-27a-3p und microRNA-193b-3p ein additiver Effekt auf die Expression von PEPT1 im Vergleich zum Effekt der einzeln transfizierten microRNAs beobachtet werden. Der gewählte Untersuchungsansatz ist als *in vitro*-Versuchsaufbau insofern limitiert, als dass beispielsweise schon eine einzelne microRNA zu einer Sättigung des Repressionspfades führen kann (129), weswegen Interaktionen *in-vivo* nicht auszuschließen sind (130). Es erscheint hier sinnvoll weitere Studien, insbesondere *in-vivo*-Studien anzuschließen, die die Interaktionen der microRNAs auf ein Zielgen mit unterschiedlichen microRNA-Konzentrationen untersuchen. Es ist bekannt, dass die Konzentration von microRNAs, insbesondere bei Versuchsaufbauten mit mehreren Effektor-microRNAs, einen starken Einfluss auf ihre Interaktionen mit einem Zielgen hat (131).

Während die auf microRNAs ausgeübten regulatorischen Einflüsse ebenso noch weiterer Erforschung benötigen wie die Zusammenhänge zwischen microRNAs, Karzinogenese und der Entstehung von Chemotherapeutikaresistenz, liefert diese Arbeit eine Erklärung der Unterschiede in mRNA- und Proteinexpression von Transporterproteinen. Außerdem konnten, neben der erstmaligen Beschreibung des microRNA-Verteilungsmuster entlang des Magen-Darm-Traktes in gesundem, menschlichem Gewebe, zuvor unbekannte Interaktionen zwischen microRNAs und Transporterproteinen beschrieben und schon bekannte Interaktionen bestätigt werden. Wissen über diesen Einfluss post-transkriptioneller Modifikationen wie der microRNA vermittelten RNA-Interferenz auf die Expression der Transporterproteine ist elementar, um Annahmen über die Menge der Transporterproteine im Physiologischen formulieren und Vorhersagen über die Veränderungen im Pathologischen treffen zu können. Die in dieser Arbeit herausgearbeiteten Interaktionen stellen einen Schritt auf dem langen Weg zu einem besseren Verständnis dieser regulatorischen Beziehungen

dar. Kenntnisse über die interindividuelle Variabilität im Metabolismus von Pharmaka sind auf dem Weg zur personalisierten Medizin mit einer für den einzelnen Patienten optimierten Therapie unerlässlich. Mit dieser individuell zugeschnittenen Therapie soll ein ausreichend hoher Blutspiegel eines Arzneimittels bei möglichst geringer Schwankung und dadurch wenig unerwünschten Arzneimittelwirkungen gewährleistet werden. Hierfür ist es von entscheidender Bedeutung die individuelle Pharmakokinetik des Patienten zu kennen. Ein wichtiger Schritt ist die Resorption im Gastrointestinaltrakt, die durch die in dieser Arbeit untersuchten Transporterproteine geleistet wird (132).

5 Zusammenfassung

Für die systemische Verfügbarkeit eines oral applizierten Arzneistoffes ist dessen Resorption von entscheidender Bedeutung. Neben physiko-chemischen Eigenschaften des Arzneistoffs spielen hierbei vor allem gastrointestinale Transporterproteine der ABC- und SLC-Familien eine wichtige Rolle. Deren Verteilung entlang des Gastrointestinaltraktes wurde von Drozdik et al. (2014) ausführlich beschrieben. Dabei fiel auf, dass die einzelnen Transporter in Abhängigkeit zum Darmsegment unterschiedlich hohe Protein-Mengen aufwiesen. In dieser Arbeit sollte zunächst überprüft werden, ob möglicherweise miRNA-vermittelten regulatorische Einflüsse die beobachteten charakteristischen Transporter-Expressionen entlang des Darmes erklären können. Hierzu wurde zunächst das genomweite miRNA-Expressionsmuster in den von Drozdik et al. beschriebenen Darmbiopsaten von sechs gastrointestinal Gesunden (je 1 Probe aus Duodenum und Colon, je 2 Proben aus Jejunum und Ileum) bestimmt. Das so entlang des Darmes erhaltene miRNA-Expressionsmuster, wurde dann mit den von Drozdik et al. gemessenen Proteinmengen korreliert. Dadurch konnten signifikant negativ-korrelierte Transporterprotein-/microRNA-Paare identifiziert werden. Paare, die bei einer anschließenden *in-silico* Zielgenvorhersage als potentielle Interaktionspartner prädiktiert wurden, wurden dann mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assays auf eine tatsächliche Interaktion hin untersucht. Konnte für eine miRNA ein negativer regulatorischen Effekt auf das potentielle Zielgen bestätigt werden, so wurde anschließend die *seed*-Region der jeweiligen microRNA im Vektor mutiert. So konnte die Regulation der Ziel-mRNA kausal der Bindung der microRNA an die 3'-UTR zugeordnet werden. Auf diese Weise konnten für den Transporter ABCC3 die microRNA-192-5p, für ABCB1 die microRNA-27a-3p und microRNA-409-3p und für PEPT1 die microRNA-27a-3p, microRNA-193a-3p und microRNA-193b-3p als interagierend miRNAs nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass, zumindest teilweise, miRNAs an der Kontrolle des charakteristischen Transporterexpressionmuster entlang des menschlichen Darmes beteiligt sein könnten.

Der besondere Nutzen dieser Arbeit liegt in der in dieser Qualität erstmaligen Erstellung eines Expressionsmusters aller gastrointestinal exprimierten microRNAs anhand physiologischer Gewebeproben. Außerdem konnte erstmals ein regulatorischer Zusammenhang zwischen der microRNA-192-5p und dem gastrointestinal exprimierten Transporter ABCC3, zwischen microRNA-27a-3p beziehungsweise microRNA-193a-3p und PEPT1, sowie microRNA-409-3p und ABCB1 nachgewiesen werden. Diese Arbeit trägt somit nicht nur zu einem besseren und tieferen Verständnis der physiologischen Gegebenheiten im Gastrointestinaltrakt bei, sondern soll auch als physiologischer Vergleich für Studien dienen, die sich mit pathologisch verändertem Gewebe des Intestinums und dem Phänomen der Chemotherapeutika-Resistenz von Tumorzellen beschäftigen.

Summary

Intestinal absorption is a key step in drug delivery. For oral applied drugs it is transporter proteins of ABC- and SLC-family type that do most of the absorption. Distribution of these transporter proteins along the gastrointestinal tract has been thoroughly described by Drozdik et al. (2014), noting a differing transporter protein abundance depending on the part of the intestine. The aim of this thesis was to investigate, if the aforementioned protein distribution along the intestine can be explained miRNA regulation.

At first a screening for microRNAs using biopsies from six gastrointestinal healthy subjects (1 from duodenum and colon each, 2 from jejunum and ileum each) was conducted. This way an expression pattern for microRNAs along the intestine could be shown. In addition this expression data was correlated with the protein abundance measured by Drozdik et al. conducting negative-significant correlated pairs of microRNAs and Transporterproteins. Pairs with a positive target gene prediction were chosen for further analysis using Luciferase-Reporter-Gene-Assays to determine the presence of an actual microRNA interaction. Pairs showing a significant downregulation of the targeted transporter protein were subsequently confirmed by site-directed-mutagenesis, mutating the microRNA's seed-region in its target vector. Thus, regulation of a transporter was causally attributed to the binding of the respective microRNA to the vector's 3'-UTR. In this manner, the following interactions were revealed: the transporter ABCC3 is regulated by microRNA-192-5p, ABCB1 by microRNA-27a-3p and microRNA-409-3p, PEPT1 by microRNA-27a-3p, microRNA-193a-3p and microRNA-193b-3p. These results suggest, that microRNAs are at least partially involved in creating the characteristic transporterprotein abundance along the human intestine.

The results of this thesis show for the first time the expression profile of all gastrointestinal expressed microRNAs in the continuum of the physiological intestine. Additionally, for changes in abundance of transporter proteins depending on the respective gut segment, several regulatory microRNAs were newly described. Known microRNAs from studies on pathological tissue were confirmed using physiological probes. This study contributes to the knowledge on regulation of transporter proteins and therefore extends the understanding of interindividual variability of drug absorption.

6 Literaturverzeichnis

1. Drozdzik M, Gröer C, Penski J, Lapczuk J, Ostrowski M, Lai Y, et al. Protein Abundance of Clinically Relevant Multidrug Transporters along the Entire Length of the Human Intestine. *Mol Pharmaceutics*. 2014 Oct 6;11(10):3547–55.
2. Abbasi MM, Valizadeh H, Hamishekar H, Mohammadnejad L, Zakeri-Milani P. Inhibitory effect of clemastine on P-glycoprotein expression and function: an in vitro and in situ study. *Iran J Basic Med Sci. Mashhad University of Medical Sciences*; 2016 Apr;19(4):423–9.
3. Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. 7 ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008.
4. Kimura T, Higaki K. Gastrointestinal transit and drug absorption. *Biol Pharm Bull*. 2002 Feb;25(2):149–64.
5. Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S. *Pharmakologie und Toxikologie*.
6. Schiller C, Fröhlich C-P, GIESSMANN T, Siegmund W, Mönnikes H, Hosten N, et al. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther*. Blackwell Science Ltd; 2005 Nov 15;22(10):971–9.
7. Gavhane YN, Yadav AV. Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharm J*. 2012 Oct;20(4):331–44.
8. Klebe PDG. *Wirkstoffdesign*. Vol. 2.
9. Herdegen T, editor. *Grundlagen der Pharmakotherapie*. In: *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2014.
10. Russel FGM. Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. In: Pang KS, Rodrigues AD, Peter RM, editors. *Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions*. New York, NY: Springer New York; 2009. pp. 27–49.
11. Hediger MA, Romero MF, Peng J-B, Rolfs A, Takanaga H, Bruford EA. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteinsIntroduction. *Pflugers Arch*. Springer-Verlag; 2004 Feb;447(5):465–8.
12. Dobson PD, Kell DB. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Mar;7(3):205–20.
13. International Transporter Consortium, Giacomini KM, Huang S-M, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KLR, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Mar;9(3):215–36.

14. Hagenbuch B, Gui C. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. Taylor & Francis; 2008 Jul;38(7-8):778–801.
15. Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr;34(2-3):413–35.
16. Claro da Silva T, Polli JE, Swaan PW. The solute carrier family 10 (SLC10): beyond bile acid transport. *Mol Aspects Med*. 2013 Apr;34(2-3):252–69.
17. Jappard D, Wu S-P, Hu Y, Smith DE. Significance and regional dependency of peptide transporter (PEPT) 1 in the intestinal permeability of glycylsarcosine: in situ single-pass perfusion studies in wild-type and Pept1 knockout mice. *Drug Metab Dispos. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 2010 Oct;38(10):1740–6.
18. Szakács G, Váradi A, Ozvegy-Laczka C, Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov Today*. 2008 May;13(9-10):379–93.
19. Friedrich RE, Punke C, Reymann A. Expression of multi-drug resistance genes (mdr1, mrp1, bcrp) in primary oral squamous cell carcinoma. *In Vivo*. 2004 Mar;18(2):133–47.
20. Jakobsen GS, Skottheim IB, Sandbu R, Christensen H, Røislien J, Asberg A, et al. Long-term effects of gastric bypass and duodenal switch on systemic exposure of atorvastatin. *Surg Endosc. Springer-Verlag*; 2013 Jun;27(6):2094–101.
21. Skottheim IB, Jakobsen GS, Stormark K, Christensen H, Hjelmessaeth J, Jenssen T, et al. Significant increase in systemic exposure of atorvastatin after biliopancreatic diversion with duodenal switch. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2010 Jun;87(6):699–705.
22. Barr WH, Zola EM, Candler EL, Hwang SM, Tendolkar AV, Shamburek R, et al. Differential absorption of amoxicillin from the human small and large intestine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1994 Sep;56(3):279–85.
23. Gramatté T, Oertel R, Terhaag B, Kirch W. Direct demonstration of small intestinal secretion and site-dependent absorption of the beta-blocker talinolol in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 1996 May;59(5):541–9.
24. Berggren S, Gall C, Wollnitz N, Ekelund M, Karlbom U, Hoogstraate J, et al. Gene and protein expression of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and CYP3A4 in the small and large human intestine. *Mol Pharmaceutics*. 2007 Mar;4(2):252–7.
25. Englund G, Rorsman F, Rönnblom A, Karlbom U, Lazorova L, Gråsjö J, et al. Regional levels of drug transporters along the human intestinal tract: Co-expression of ABC and SLC transporters and comparison with Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006 Nov;29(3-4):269–77.

26. Hilgendorf C, Ahlin G, Seithel A, Artursson P, Ungell A-L, Karlsson J. Expression of thirty-six drug transporter genes in human intestine, liver, kidney, and organotypic cell lines. *Drug Metab Dispos. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 2007 Aug;35(8):1333–40.
27. Meier Y, Eloranta JJ, Darimont J, Ismail MG, Hiller C, Fried M, et al. Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab Dispos. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 2007 Apr;35(4):590–4.
28. Olivares-Morales A, Lennernäs H, Aarons L, Rostami-Hodjegan A. Translating Human Effective Jejunal Intestinal Permeability to Surface-Dependent Intrinsic Permeability: a Pragmatic Method for a More Mechanistic Prediction of Regional Oral Drug Absorption. *AAPS J. Springer US*; 2015 Sep;17(5):1177–92.
29. Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Rönnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Mar;13(3):291–7.
30. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editors. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014.
31. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet*. 2012 Apr;13(4):271–82.
32. Molnár A, Schwach F, Studholme DJ, Thuenemann EC, Baulcombe DC. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nature*. Nature Publishing Group; 2007 Jun 28;447(7148):1126–9.
33. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. Nature Publishing Group; 2010 Sep;11(9):597–610.
34. Ebert MS, Sharp PA. Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell*. 2012 Apr;149(3):515–24.
35. Zhao X-L, Yang B, Ma L-N, Dong Y-H. MicroRNA-1 effectively induces differentiation of myocardial cells from mouse bone marrow mesenchymal stem cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016 Nov;44(7):1665–70.
36. Song J, Oh Y, Kim JY, Cho KJ, Lee JE. Suppression of MicroRNA let-7a Expression by Agmatine Regulates Neural Stem Cell Differentiation. *Yonsei Med J*. 2016 Nov;57(6):1461–7.
37. Cong J, Liu R, Wang X, Jiang H, Zhang Y. MiR-634 decreases cell proliferation and induces apoptosis by targeting mTOR signaling pathway in cervical cancer cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016 Nov;44(7):1694–701.
38. Wang D-D, Chen X, Yu D-D, Yang S-J, Shen H-Y, Sha H-H, et al. miR-197: A novel biomarker for cancers. *Gene*. 2016 Oct 15;591(2):313–9.

39. Hemmatzadeh M, Mohammadi H, Karimi M, Musavishenas MH, Baradaran B. Differential role of microRNAs in the pathogenesis and treatment of Esophageal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2016 Aug;82:509–19.
40. Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, et al. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2009 May;41(5):609–13.
41. Wu Q, Han L, Yan W, Ji X, Han R, Yang J, et al. miR-489 inhibits silica-induced pulmonary fibrosis by targeting MyD88 and Smad3 and is negatively regulated by lncRNA CHRF. *Sci Rep*. Nature Publishing Group; 2016;6:30921.
42. Hauberg ME, Roussos P, Grove J, Børglum AD, Mattheisen M, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Analyzing the Role of MicroRNAs in Schizophrenia in the Context of Common Genetic Risk Variants. *JAMA Psychiatry*. American Medical Association; 2016 Apr;73(4):369–77.
43. McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, et al. MicroRNAs Control Intestinal Epithelial Differentiation, Architecture, and Barrier Function. *YGASt*. Elsevier Inc; 2010 Nov 1;139(5):1654–1664.e1.
44. Haenisch S, Werk AN, Cascorbi I. MicroRNAs and their relevance to ABC transporters. *Br J Clin Pharmacol*. 2014 Mar 20;77(4):587–96.
45. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nature Publishing Group; 2009 Feb;10(2):126–39.
46. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. EMBO Press; 2004 Oct 13;23(20):4051–60.
47. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097–101.
48. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642–55.
49. Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4663–70.
50. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. Nature Publishing Group; 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
51. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Lab; 2004 Dec 15;18(24):3016–27.

-
52. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004 Feb;10(2):185–91.
 53. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2009 Nov 27;326(5957):1275–9.
 54. Merritt WM, Bar-Eli M, Sood AK. The dicey role of Dicer: implications for RNAi therapy. *Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2010 Apr 1;70(7):2571–4.
 55. Graw J. *Genetik*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.
 56. Takahashi T, Miyakawa T, Zenno S, Nishi K, Tanokura M, Ui-Tei K. Distinguishable in vitro binding mode of monomeric TRBP and dimeric PACT with siRNA. Hofmann A, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2013;8(5):e63434.
 57. Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Mol Genet Genomics*. Springer-Verlag; 2010 Aug;284(2):95–103.
 58. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):209–16.
 59. Nakanishi K. Anatomy of RISC: how do small RNAs and chaperones activate Argonaute proteins? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. John Wiley & Sons, Inc; 2016 Sep;7(5):637–60.
 60. Ameres SL, Zamore PD. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Aug;14(8):475–88.
 61. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press; 2005;33(20):e179–9.
 62. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Academy of Sciences; 1988 Dec;85(23):8790–4.
 63. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ method. *methods*. 2001;25(4):402.
 64. de Hoon MJL, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics*. 2004 Jun 12;20(9):1453–4.
 65. Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn*. Elsevier; 2003 May;5(2):73–81.

-
66. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics*. 2004 Nov 22;20(17):3246–8.
 67. 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. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Sep 11;18(10):1139–46.
 68. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*. 2008 Jan;36(Database issue):D154–8.
 69. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*. 1977 Feb 24;265(5596):687–95.
 70. Gröer C, Brück S, Lai Y, Paulick A, Busemann A, Heidecke CD, et al. LC–MS/MS-based quantification of clinically relevant intestinal uptake and efflux transporter proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2013 Nov;85:253–61.
 71. 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* (.... 1995.
 72. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Ben Bolstad, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol. BioMed Central*; 2004 Sep 15;5(10):R80.
 73. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. 2014.
 74. Chen Z, Ma T, Huang C, Zhang L, Lv X, Xu T, et al. MiR-27a modulates the MDR1/P-glycoprotein expression by inhibiting FZD7/beta-catenin pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Signal*. 2013 Dec;25(12):2693–701.
 75. Li Z, Hu S, Wang J, Cai J, Xiao L, Yu L, et al. MiR-27a modulates MDR1/P-glycoprotein expression by targeting HIPK2 in human ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*. 2010 Oct;119(1):125–30.
 76. Zhu H, Wu H, Liu X, Evans BR, Medina DJ, Liu C-G, et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. *Biochemical Pharmacology*. 2008 Sep 1;76(5):582–8.
 77. Feng D-D, Zhang H, Zhang P, Zheng Y-S, Zhang X-J, Han B-W, et al. Down-regulated miR-331-5p and miR-27a are associated with chemotherapy resistance and relapse in leukaemia. *J Cell Mol Med*. Blackwell Publishing Ltd; 2011 Oct;15(10):2164–75.
 78. Dai X, Chen X, Chen Q, Shi L, Liang H, Zhou Z, et al. MicroRNA-193a-3p Reduces Intestinal Inflammation in Response to Microbiota via Down-regulation of Colonic PepT1. *J Biol Chem*. 2015 Jun;290(26):16099–115.

-
79. Zhang H, Li M, Han Y, Hong L, Gong T, Sun L, et al. Down-regulation of miR-27a might reverse multidrug resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *Dig Dis Sci*. Springer US; 2010 Sep;55(9):2545–51.
 80. Zhao X, Yang L, Hu J, Ruan J. miR-138 might reverse multidrug resistance of leukemia cells. *Leuk Res*. Elsevier; 2010 Aug;34(8):1078–82.
 81. Dalmasso G, Nguyen HTT, Yan Y, Laroui H, Charania MA, Obertone TS, et al. MicroRNA-92b regulates expression of the oligopeptide transporter PepT1 in intestinal epithelial cells. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010 Dec 29;300(1):G52–9.
 82. Markova SM, Kroetz DL. ABCC4 is regulated by microRNA-124a and microRNA-506. *Biochemical Pharmacology*. 2014 Feb 1;87(3):515–22.
 83. Moore KJ, Rayner KJ, Suárez Y, Fernández-Hernando C. microRNAs and cholesterol metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2010 Dec;21(12):699–706.
 84. Rayner KJ, Suárez Y, Dávalos A, Parathath S, Fitzgerald ML, Tamehiro N, et al. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2010 Jun 18;328(5985):1570–3.
 85. Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: Implication for intestinal barrier function. *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc; 2014 Aug 1;143(2):217–24.
 86. Seithel A, Karlsson J, Hilgendorf C, Björquist A, Ungell A-L. Variability in mRNA expression of ABC- and SLC-transporters in human intestinal cells: Comparison between human segments and Caco-2 cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006 Jul;28(4):291–9.
 87. Mouly S, Paine MF. P-glycoprotein increases from proximal to distal regions of human small intestine. *Pharm Res*. 2003 Oct;20(10):1595–9.
 88. Zimmermann C, Gutmann H, Hruz P, Gutzwiller J-P, Beglinger C, Drewe J. Mapping of multidrug resistance gene 1 and multidrug resistance-associated protein isoform 1 to 5 mRNA expression along the human intestinal tract. *Drug Metab Dispos*. American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics; 2005 Feb;33(2):219–24.
 89. Stojančević M, Bojić G, Salami HA, Mikov M. The Influence of Intestinal Tract and Probiotics on the Fate of Orally Administered Drugs. *Curr Issues Mol Biol*. 2014;16:55–68.
 90. Sommer F, Nookaew I, Sommer N, Fogelstrand P, Bäckhed F. Site-specific programming of the host epithelial transcriptome by the gut microbiota. *Genome Biol*. BioMed Central; 2015 Mar 28;16(1):62.
 91. Wang D, Xia M, Yan X, Li D, Wang L, Xu Y, et al. Gut microbiota metabolism of anthocyanin promotes reverse cholesterol transport in mice via repressing

- miRNA-10b. *Circulation Research*. American Heart Association, Inc; 2012 Sep 28;111(8):967–81.
92. Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MAA, Pajecki D, Moura EG, Alves PRA, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007 Feb;62(1):47–54.
93. Gavrilas LI, Ionescu C, Tudoran O, Lisencu C, Balacescu O, Miere D. The Role of Bioactive Dietary Components in Modulating miRNA Expression in Colorectal Cancer. *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2016;8(10):590.
94. Palmer JD, Soule BP, Simone BA, Zaorsky NG, Jin L, Simone NL. MicroRNA expression altered by diet: can food be medicinal? *Ageing Res Rev*. 2014 Sep;17:16–24.
95. Chang L-C, Yu Y-L. Dietary components as epigenetic-regulating agents against cancer. *Biomedicine (Taipei)*. China Medical University; 2016 Mar;6(1):2–8.
96. Ross SA, Davis CD. The emerging role of microRNAs and nutrition in modulating health and disease. *Annu Rev Nutr*. Annual Reviews; 2014;34(1):305–36.
97. Marsit CJ, Eddy K, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2006 Nov 15;66(22):10843–8.
98. Simone NL, Soule BP, Ly D, Saleh AD, Savage JE, Degraff W, et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *Blagosklonny MV*, editor. *PLoS ONE*. Public Library of Science; 2009 Jul 27;4(7):e6377.
99. Goljanek-Whysall K, Iwanejko LA, Vasilaki A, Pekovic-Vaughan V, McDonagh B. Ageing in relation to skeletal muscle dysfunction: redox homeostasis to regulation of gene expression. *Mamm Genome*. Springer US; 2016 Aug;27(7-8):341–57.
100. Asquith M, Pasala S, Engelmann F, Haberthur K, Meyer C, Park B, et al. Chronic ethanol consumption modulates growth factor release, mucosal cytokine production, and microRNA expression in nonhuman primates. *Alcohol Clin Exp Res*. 2014 Apr;38(4):980–93.
101. Kobayashi M, Funayama R, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Wnt- β -catenin signaling regulates ABCC3 (MRP3) transporter expression in colorectal cancer. *Cancer Sci*. 2016 Oct 6;107(12):1776–84.
102. Liu X, Yao D, Liu C, Cao Y, Yang Q, Sun Z, et al. Overexpression of ABCC3 promotes cell proliferation, drug resistance, and aerobic glycolysis and is associated with poor prognosis in urinary bladder cancer patients. *Tumour Biol*. Springer Netherlands; 2016 Jun;37(6):8367–74.
103. Mohammadi A, Mansoori B, Baradaran B. The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2016 Oct 1;84:705–13.

104. Tsikitis VL, White I, Mori M, Potter A, Bhattacharyya A, Hamilton SR, et al. Differential expression of microRNA-320a, -145, and -192 along the continuum of normal mucosa to high-grade dysplastic adenomas of the colorectum. *Am J Surg*. 2014 May;207(5):717–22–discussion722.
105. Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, Wisecarver JL, Are C, Brattain M, et al. MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer. *Oncogene*. Nature Publishing Group; 2014 Nov 13;33(46):5332–40.
106. Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, Moll UM, Schepeler T, et al. p53-Responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2008 Dec 15;68(24):10094–104.
107. Karaayvaz M, Pal T, Song B, Zhang C, Georgakopoulos P, Mehmood S, et al. Prognostic significance of miR-215 in colon cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2011 Dec;10(4):340–7.
108. Hayashi Y, Tsujii M, Kodama T, Akasaka T, Kondo J, Hikita H, et al. p53 functional deficiency in human colon cancer cells promotes fibroblast-mediated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis*. Oxford University Press; 2016 Oct;37(10):972–84.
109. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. National Acad Sciences; 2004 Mar 2;101(9):2999–3004.
110. Mazar J, DeBlasio D, Govindarajan SS, Zhang S, Perera RJ. Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans. *FEBS Lett*. 2011 Aug 4;585(15):2467–76.
111. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 2006 Jun;9(6):435–43.
112. Chen P-S, Su J-L, Hung M-C. Dysregulation of microRNAs in cancer. *J Biomed Sci*. BioMed Central; 2012;19(1):90.
113. Mayr C, Bartel DP. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell*. 2009 Aug 21;138(4):673–84.
114. Messingerova L, Imrichova D, Kavcova H, Seres M, Sulova Z, Breier A. A decrease in cellular microRNA-27a content is involved in azacytidine-induced P-glycoprotein expression in SKM-1 cells. *Toxicol In Vitro*. 2016 Oct;36:81–8.
115. Josson S, Gururajan M, Hu P, Shao C, Chu G-Y, Zhau HE, et al. miR-409-3p/-5p promotes tumorigenesis, epithelial-to-mesenchymal transition, and bone metastasis of human prostate cancer. *Clin Cancer Res*. American Association for Cancer Research; 2014 Sep 1;20(17):4636–46.

116. Jossion S, Gururajan M, Sung SY, Hu P, Shao C, Zhau HE, et al. Stromal fibroblast-derived miR-409 promotes epithelial-to-mesenchymal transition and prostate tumorigenesis. *Oncogene*. 2015 May 21;34(21):2690–9.
117. Zheng B, Liang L, Huang S, Zha R, Liu L, Jia D, et al. MicroRNA-409 suppresses tumour cell invasion and metastasis by directly targeting radixin in gastric cancers. *Oncogene*. 2012 Oct 18;31(42):4509–16.
118. Wan L, Zhu L, Xu J, Lu B, Yang Y, Liu F, et al. MicroRNA-409-3p functions as a tumor suppressor in human lung adenocarcinoma by targeting c-Met. *Cell Physiol Biochem*. Karger Publishers; 2014;34(4):1273–90.
119. Tan S, Shi H, Ba M, Lin S, Tang H, Zeng X, et al. miR-409-3p sensitizes colon cancer cells to oxaliplatin by inhibiting Beclin-1-mediated autophagy. *Int J Mol Med*. Spandidos Publications; 2016 Apr;37(4):1030–8.
120. Li C, Nie H, Wang M, Su L, Li J, Yu B, et al. MicroRNA-409-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting PHF10 in gastric cancer. *Cancer Lett*. Elsevier; 2012 Jul 28;320(2):189–97.
121. Zhou H, Lin C, Zhang Y, Zhang X, Zhang C, Zhang P, et al. miR-506 enhances the sensitivity of human colorectal cancer cells to oxaliplatin by suppressing MDR1/P-gp expression. *Cell Prolif*. 2017 Jun;50(3):e12341.
122. Wang M, Huang C, Su Y, Yang C, Xia Q, Xu D-J. Astragaloside II sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil via suppression of autophagy. *J Pharm Pharmacol*. 2017 Jun;69(6):743–52.
123. Yuan C-H, Horng C-T, Lee C-F, Chiang N-N, Tsai F-J, Lu C-C, et al. Epigallocatechin gallate sensitizes cisplatin-resistant oral cancer CAR cell apoptosis and autophagy through stimulating AKT/STAT3 pathway and suppressing multidrug resistance 1 signaling. *Environ Toxicol*. 2017 Mar;32(3):845–55.
124. Penson RT, Oliva E, Skates SJ, Glyptis T, Fuller AF, Goodman A, et al. Expression of multidrug resistance-1 protein inversely correlates with paclitaxel response and survival in ovarian cancer patients: a study in serial samples. *Gynecol Oncol*. 2004 Apr;93(1):98–106.
125. Foley DW, Rajamanickam J, Bailey PD, Meredith D. Bioavailability through PepT1: the role of computer modelling in intelligent drug design. *Curr Comput Aided Drug Des*. Europe PMC Funders; 2010 Mar;6(1):68–78.
126. Freeman HJ. Clinical relevance of intestinal peptide uptake. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2015 May 6;6(2):22–7.
127. Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman SV, Eastburn K, Williams I, Liu X, et al. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *YGASt*. 2001 Jun;120(7):1666–79.

128. Hashimoto Y, Akiyama Y, Yuasa Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. Suzuki H, editor. PLoS ONE. Public Library of Science; 2013;8(5):e62589.
129. Söber S, Laan M, Annilo T. MicroRNAs miR-124 and miR-135a are potential regulators of the mineralocorticoid receptor gene (NR3C2) expression. Biochem Biophys Res Commun. 2010 Jan 1;391(1):727–32.
130. Sullivan RP, Leong JW, Schneider SE, Ireland AR, Berrien-Elliott MM, Singh A, et al. MicroRNA-15/16 Antagonizes Myb To Control NK Cell Maturation. J Immunol. American Association of Immunologists; 2015 Sep 15;195(6):2806–17.
131. Tsai D-Y, Hung K-H, Lin I-Y, Su S-T, Wu S-Y, Chung C-H, et al. Uncovering MicroRNA Regulatory Hubs that Modulate Plasma Cell Differentiation. Sci Rep. Nature Publishing Group; 2015 Dec 11;5:17957.
132. Stingl JC, Just KS, Kaumanns K, Schurig-Urbaniak M, Scholl C, Mallek von D, et al. [Personalized drug therapy based on genetics. Possibilities and examples from clinical practice]. Internist (Berl). Springer Berlin Heidelberg; 2016 Mar;57(3):289–97.

Danksagung

Ich möchte mich bei jedem bedanken, der mich bei der Anfertigung meiner Dissertation, ob praktischer oder theoretischer Natur, unterstützt hat. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi, Frau Dr. H. Bruckmüller und Herrn Dr. S. Haenisch für die stets exzellente Betreuung, Zusammenarbeit und Hilfestellungen bei Problemen.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holsteins, Campus Kiel; insbesondere Frau. M. Kähler, Frau B. Schwarten und Frau M. Neubert.

Herrn Prof. Dr. S. Oswald und Herrn. Prof. Dr. W. Siegmund vom Institut für Klinische Pharmakologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald danke ich für die angenehme und unkomplizierte Kooperation.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meinen Großeltern, Eltern, Freunden und meiner Freundin für den Rückhalt in schwierigen Zeiten und für das Verständnis, das mir immer entgegengebracht wurde.

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.

Kiel, 02.03.2018

Paul Martin

Publikationen

Henrike Bruckmueller, **Paul Martin**, Meike Kähler, Sierk Haenisch, Marek Drozdziak, Werner Siegmund, Ingolf Cascorbi, Stefan Oswald. Clinically relevant multidrug transporters are regulated by microRNAs along the human intestine

In Vorbereitung:

Kenneth Linton, **Paul Martin**, Rebecca Headon, Bennett D. 'Deep Blue' Verses Arthroplasty Surgeon: Validating The Benefits Of Computer-Templated Total Knee Replacement.

Posterbeiträge

Martin P, Bruckmüller H, Cascorbi I, Drozdziak M, Oswald S, Haenisch S, Siegmund W.
Site-specific miRNA Expression influences / controls Transporter Protein Abundance
along the human intestine.

81. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Kiel, A 086, 2015