

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik

Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse
Prof. Dr. med. Samuel Huber

Die Untersuchung von hepatischer MicroRNA-122 in chimären (Hepatitis-infizierten) UPA/SCID Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Philipp Maximilian Fritze
Geb. 5.1.1993 in Hamburg

Hamburg 2022

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.06.2023**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Gisa Tiegs

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Maura Dandri

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1	<i>Hepatitis B</i>	5
1.1.1	Epidemiologie und Verlauf.....	5
1.1.2	Taxonomie und Lebenszyklus.....	7
1.2	<i>Hepatitis C</i>	8
1.3	<i>Hepatitis D</i>	8
1.4	<i>Das UPA/SCID Mausmodell</i>	9
1.5	<i>MicroRNA</i>	12
1.5.1	microRNA und HBV.....	14
1.5.2	miR-122.....	14
1.6	<i>Ziele dieser Arbeit</i>	18
2	Material und Methoden	19
2.1	<i>Maus-Modell und Probengewinnung</i>	19
2.2	<i>Anreicherung/ Extraktion der Micro-RNA</i>	19
2.3	<i>cDNA-Synthese und Amplifikation</i>	20
2.4	<i>TaqMan® Advanced miRNA Assay</i>	21
2.5	<i>Affymetrix viewRNA miRNA ISH Assay</i>	21
2.5.1	Variation mit Affymetrix viewRNA miRNA ISH PLUS Assay.....	25
2.6	<i>Graph Pad Prism</i>	25
3	Ergebnisse	26
3.1	<i>Untersuchung der Expression von microRNA in chimären UPA/SCID-Mauslebern mittels rtPCR</i>	26
3.1.1	Etablierung eines Messverfahrens mit rtPCR.....	27
3.1.2	Messung mehrerer, HBV-assoziiertes microRNA.....	30
3.1.3	Expression von miR-122 in chimären Mauslebern mit unterschiedlichen, viralen Hepatitiden ...	31
3.2	<i>Vorkommen von MicroRNA im murinen Serum-rtPCR mit Spike Verfahren</i>	33
3.2.1	Einführung des Spike-Verfahrens für Serumanalysen.....	33
3.2.2	Freie miR-122 im Serum infizierter Tiere vs. humanes Kontrollserum.....	34
3.3	<i>Etablierung des Hybridisierungsprotokolls für MicroRNA in Leberkryotomschnitten</i>	35
3.3.1	MicroRNA in-situ Hybridisierung.....	35
3.3.2	Variation des Hybridisierungsprotokolls. Implementierung des viewRNA plus Moduls.....	39
3.4	<i>Nachweis durch Hybridisierung von hepatischer microRNA-122 im Rahmen verschiedener viraler Hepatitiden</i>	41
3.4.1	Bestimmung der intrazellulären miR-122 Menge in Abhängigkeit der Viruslast.....	41
4	Diskussion	49
5	Zusammenfassung der Ergebnisse	57
6	Abkürzungsverzeichnis	59
7	Literaturverzeichnis	61
8	Abbildungsverzeichnis	67
9	Danksagung	68

10	Lebenslauf.....	69
11	Eidesstattliche Versicherung.....	70

1. Einleitung

1.1 Hepatitis B

1.1.1 Epidemiologie und Verlauf

Weltweit stellt die Infektion mit dem Hepatitis B Virus (HBV) trotz des funktionierenden Impfstoffes eines der größten gesundheitlichen Probleme dar. Im Jahre 2015 waren ca. 260 Millionen Menschen Träger einer chronischen HBV-Infektion (im Vergleich dazu 71 Millionen chronisch Hepatitis-C-(HCV)-Infizierte), wovon 68% allein auf die Bevölkerung in Asien entfällt (WHO, 2017). Laut dem „Global Hepatitis Report 2017“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sieht die Strategie zur Bekämpfung und schließlich Auslöschung der Erkrankung zunächst eine drastische Reduzierung der Neuinfektionen um 90% durch primärpräventive Maßnahmen vor. Darüber hinaus sollen mindestens 80% der infizierten Menschen einer Therapie zugeführt werden und die Mortalität um 65% gesenkt werden (WHO, 2017). Im 2021 erschienenen Fortschrittsbericht der WHO (Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021) wird ersichtlich, dass die Verstärkung der primärpräventiven Maßnahmen erste Erfolge zeigt. 2019 erhielten 85% der Kinder weltweit einen vollständigen Impfschutz gegen Hepatitis B, die Rate der HbsAg-Träger in der Altersgruppe fiel auf unter 1%. Jedoch zeigt sich laut WHO-Bericht, dass im selben Jahr (2019) nur bei ca. 10% der infizierten Menschen die Diagnose tatsächlich gestellt wurde und lediglich 2% der Hepatitis B positiven Patienten eine adäquate Behandlung erhielten, was die durch die WHO gesetzten Zielwerte noch deutlich unterschreitet (World Health Organisation, 2021).

Die Herangehensweise der WHO ist schlüssig, wenn man das Augenmerk auf den typischen Verlauf einer Infektion mit dem HB-Virus legt: Das Virus kann im Wirtsorganismus sowohl eine akute als auch eine chronische Hepatitis hervorrufen. Im Gegensatz zu anderen viralen Hepatitiden bleibt die chronische HBV-Infektion in großer Zahl der Fälle zunächst klinisch inapparent, sodass der Träger meist einer Therapie entzogen bleibt und über infektiöse Körperflüssigkeiten zur Verbreitung beiträgt. Die Transmission kann dabei genauso vertikal, von infizierten Müttern auf das Neugeborene erfolgen. Insbesondere letztere Form der Übertragung hat eine hohe Rate an chronischen Infektionen unter Kindern zur Folge. Der Übertragungsweg ist in

den Endemiegebieten in Afrika und Asien typischerweise überwiegend vertikal, in den westlichen Ländern eher horizontal (Nguyen, Wong, Gane, Kao, & Dusheiko, 2020).

Dauerhafte, asymptomatische Träger des HBsAg zeigen i.d.R. auch nach mehrjähriger Infektion keine erhöhten Transaminasewerte oder pathologischen Veränderung des Leberparenchyms, sodass das HB-Virus insgesamt als nicht-zytopathisch betrachtet wird (De Franchis et al., 1993). Dennoch zeigen 15-40% der dauerhaften Träger gravierende Spätfolgen wie das Auftreten einer Leberzirrhose, eines Leberversagens oder eines hepatozellulären Karzinoms (HCC), weswegen neben der Primärprävention ein systematisches und umfassendes Follow-up der bereits erkrankten Patienten zur Senkung der Mortalität notwendig ist (Lok & McMahon, 2009). Insgesamt scheint ein akuter Anstieg der Transaminasen infizierter Patienten für eine erfolgreiche Immunantwort zu sprechen, sodass beim Ausbleiben einer adäquaten Immunantwort die laborchemischen Leberparameter eher unauffällig bleiben und es zur viralen Persistenz mit konsekutiver Infektiösität kommt (Peters et al., 1991). Die groß angelegte REVEAL HBV- Studie aus Taiwan im Jahre 2006 belegte darüber hinaus, dass in einem Kollektiv nicht behandelter, HBV positiver Patienten die gemessene Viruslast positiv mit der Inzidenz von hepatozellulären Karzinomen korreliert (Chen et al., 2006).

State-of-the-art antivirale Therapien (Entecavir, Tenofovir, Tenofoviralfenamid), wie sie heutzutage bei chronisch HBV infizierten Patienten zum Einsatz kommen, senken das Risiko eines sekundären HCC zwar drastisch (insbesondere Patienten mit bereits bestehender Leberzirrhose profitieren), jedoch lässt sich bisweilen keine gänzliche Normalisierung des Risikos erreichen (Papatheodoridis, Chan, Hansen, Janssen, & Lampertico, 2015).

Grundsätzlich ist die Reduktion der serologischen Parameter unter die Nachweisgrenze, ähnlich der Therapie einer HIV-Erkrankung, nicht als kurative, antivirale Therapie zu betrachten, sodass bei Beendigung der Therapie eine erneute Replikation von HBV-DNA (folglich mit Synthese viraler Proteine) zu erwarten ist (Dean, Bowden, & Locarnini, 1995). Dies bedingt für die betroffenen Patienten eine lebenslange, medizinische Überwachung und Versorgung mit den notwendigen, therapeutischen Wirkstoffen.

1.1.2 Taxonomie und Lebenszyklus

HBV entstammt der Familie der Hepadnaviridae und weist ein zirkuläres, partiell doppelstrangiges Genom aus ca. 3,2kB DNA auf. Bisweilen sind zehn verschiedene Genotypen bekannt, welche mit den Buchstaben des Alphabets A – J bezeichnet werden und in verschiedenen Gebieten der Welt endemisch sind. Das Genom gliedert sich in vier *open reading frames* (ORF), welche zur Expression der wichtigsten, viralen Proteine dienen. Es handelt sich hierbei um das *hepatitis B surface antigen* (HBs), das *hepatitis B core protein* (HBc), das regulatorische *hepatitis B X-antigen* (HBx) und die virale Polymerase (Wei & Ploss, 2021). Siehe Abbildung 1 nach (Minor & Slagle, 2014).

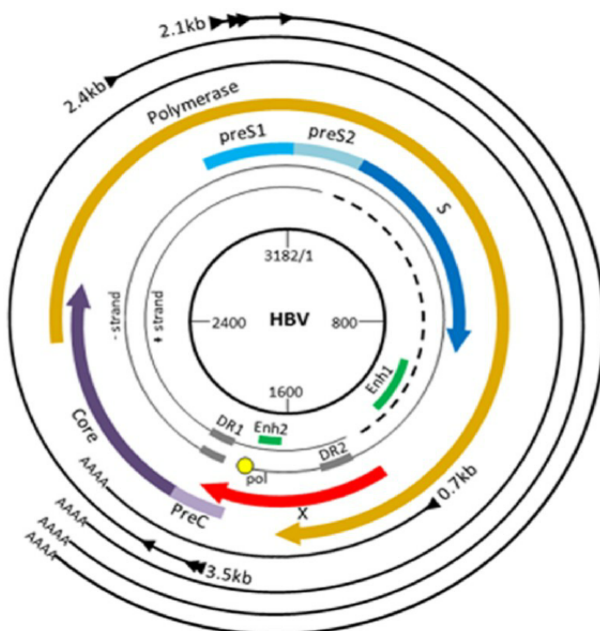


Abbildung 1.1 – **Das HBV Genom**
Schematische Darstellung des HBV- Genoms mit vier überlappenden open reading frames – entsprechend der viralen Proteine HBs, HBc, HBx und Polymerase (übernommen von Minor & Slagle, 2014)

Mikrobiologisch liegen den besonderen Charakteristika des HBV einzigartige Mechanismen zu Grunde. Das Hepatitis-B-Virus ist hepatotrop, d.h. es ist zur Einnistung und Replikation ausschließlich in Hepatozyten befähigt. Vergangene Studien konnten das Protein *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide* (NTCP) als Virus bindenden Faktor auf der Oberfläche der Hepatozyten identifizieren (Yan et al., 2012). Nach Einschleusung des Virus in die Zelle und Import in den Zellkern kommt es zur intranukleären Freisetzung der *relaxed circular DNA* (rcDNA). Diese wird nach dem Abbau der Virushülle zur sog. *covalently closed circular DNA*

(cccDNA) konvertiert. Selbige dient dann mit o.g. vier *open reading frames* als Vorlage zur Produktion der viralen Proteine.

Für die Virusreplikation wird durch die humane RNA-Polymerase II die sog. prägenomische RNA (*pre-genomic, pgRNA*) synthetisiert. Diese pgRNA wird sodann innerhalb der neuen Viruskapside mittels reverser Transkriptase zur rcDNA transkribiert. Nach Umhüllung mit HBsAg reifen die Kapside zur infektiösen Viruspartikeln, die aus der Zelle ausgeschleust werden können. Vorhergegangene

Arbeiten konnten zahlreiche, regulatorische, zelluläre Mechanismen identifizieren, die an diesem komplexen Lebenszyklus beteiligt und noch nicht vollständig ergründet sind (Review von Nguyen et al., 2020).

Die cccDNA fungiert im Nukleus als persistierendes, episomales Minichromosom zur Transkription viraler RNA – initiiert durch zelleigene, leberspezifische Transkriptionsfaktoren. Bislang konnte keine der etablierten Therapieregimes eine dauerhafte Eradikation der cccDNA aus den Hepatozyten bewirken (Quasdorff & Protzer, 2010).

1.2 Hepatitis C

Das Hepatitis-C-Virus ist ein Einzelstrang-RNA-Virus aus der Familie der *Flaviviridae*, von denen bisweilen acht verschiedenen Genotypen bekannt sind. Es wird von Mensch zu Mensch horizontal über infektiöses Blut, oder vertikal / perinatal übertragen. Im Gegensatz zur HBV-Infektion führt die Infektion mit HCV in ca. 80% der Fälle zu einer chronischen Erkrankung mit deutlich erhöhtem Risiko eine Leberzirrhose mit darauffolgendem, hepatozellulärem Karzinom (HCC). Auch eine Vielzahl von extrahepatischen Manifestationen kann beobachtet werden, insbesondere hämatologischer Natur.

Seit den 2010er Jahren steht mit den neu entwickelten Wirkstoffen Sofosbuvir, Glecaprevir, Pibrentasvir und Velpatasvir eine moderne Quadrupeltherapie zur Verfügung, welche ohne Beteiligung eines Interferon-Präparates in 99% der Anwendungen zur sog. *sustained virological response* – einer nachhaltigen Eradikation führt. Die WHO hat sich das Ziel gesetzt, die HCV-Ausbreitung bis 2030 massiv einzudämmen (Review von Torre, Aglitti, Masarone, & Persico, 2021)

1.3 Hepatitis D

Das Hepatitis D (oder Delta) -Virus wird als Einzelstrang-RNA-Virus charakterisiert und tritt lediglich als Ko-Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus auf. Grund dafür ist die Abhängigkeit von den HBV-Proteinen während der Virushüllenbildung, der Viruszusammensetzung und der Wirt-Virus-Interaktion. Die HDV/HBV Ko-Infektion betrifft schätzungsweise 4,5% der HBsAg-positiven Träger mit hohen Prävalenzen in Asien und West-, sowie Zentralafrika. Eine Superinfektion mit HDV führt in der Regel

zu deutlich rascheren und fulminanten Verläufen mit erhöhter Rate von akutem Leberversagen und Progress in Zirrhose und HCC (Review von Torre et al., 2021)

1.4 Das UPA/SCID Mausmodell

Aufgrund der weltweiten Verbreitung des HB-Virus, seiner hohen Virulenz und der Spätfolgen bedingten Mortalität ist die Erweiterung der Therapiemöglichkeiten (bei chronischer HBV-Infektion) seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Notwendig hierfür waren und sind Infektionsmodelle zur Durchführung von Grundlagen- und präklinischer Forschung. Da das HB-Virus speziesspezifisch nur Menschen (und andere Primaten) befällt, wurden hierfür verschiedene Ansätze verfolgt. Bereits in den 1970er Jahren wurden weitere Viren aus der Gruppe der Hepadnaviren identifiziert, zu denen auch das HB-Virus gehört. Zu nennen sind in diesem Rahmen das *woodchuck hepatitis virus* (WHV), das *ground squirrel hepatitis virus* (GSHV) und das *duck hepatitis virus* (DHV) (Robinson, 1980).

Durch diese HBV- ähnlichen Infektionsmodelle in anderen Säugetieren konnten viele hilfreiche Erkenntnisse über die Grundlagen des Replikationsprozesses der Hepadnaviren erlangt und mehrere, vielversprechende Therapieansätze präklinisch getestet werden (Maura Dandri, Burda, Will, & Petersen, 2000; Mason et al., 1998; Menne et al., 2005).

In vivo Studien mit dem eigentlichen, humanpathogenen HBV sind daher jedoch in den o.g. Tiermodellen nicht möglich. Hierfür stand zunächst nur die Infektion von Schimpansen, welche für das HB-Virus empfänglich sind, als Modell zur Verfügung (Wieland, 2015). Das Vorkommen von HBsAg (Australia-Antigen) im Serum von Schimpansen als Zeichen einer aktiven Infektion war bereits vor 50 Jahren erstmals beschrieben worden (Lichter, 1969). Bis heute wurden maßgebliche Kenntnisse dank der Forschung an Schimpansen gewonnen, jedoch sind ethische Probleme, Kosten und hoher Aufwand als Gründe zu sehen, die alternative, effizientere Tiermodelle notwendig werden ließen.

In Deutschland werden mit ca. 70% der Versuchstiere weit überwiegend Mäuse zur *in vivo* Forschung herangezogen (Internetquelle 1, *Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren*). Da diese jedoch auf natürlichem Wege für das Hepatitis B Virus nicht empfänglich sind, wird seit längerem der Einsatz transgener Mäuse verfolgt, welche einzelne virale Proteine, z.B. HBsAg, oder auch komplette, infektiöse HBV-Genome

exprimieren, jedoch ohne damit den natürlichen Replikationszyklus und Infektionsverlauf zu modellieren (Chisari et al., 1985; Guidotti, Matzke, Schaller, & Chisari, 1995).

Zu Beginn der 2000er wurde dann ein wesentlich weiter fortgeschrittenes und komplexeres Mausmodell zur HBV-Infektion entwickelt. Um die o.g. Nachteile der transgenen Mäuse zu umgehen, wurde ein gänzlich neuer Ansatz erdacht. Bereits zehn Jahre zuvor hatte Sandgren et al. eine Beschreibung von transgenen Mäusen publiziert, bei denen das Protein *urokinase-type plasminogen activator* (uPA), oder auch Urokinase, mit dem Promotor des Albumins gekoppelt wurde, was zu einer drastisch gesteigerten Synthese von uPA in der Leber führte. Die Peptidase uPA trägt in seiner physiologischen Funktion zur Fibrinolyse bei, sodass die gesteigerte Produktion massive, intrahepatische Hämorrhagien mit konsekutivem Parenchymschaden zur Folge hat (Sandgren et al., 1991).

Der Arbeitsgruppe Dandri et al. gelang es, die durch Urokinase-Überexpression alterierte Lebern mit kompetenten, humanen Hepatozyten zu repopulieren. Hierfür war zusätzlich der Knockout des *recombination activating gene 2*-Proteins (RAG-2) notwendig, welcher in den Versuchstieren die Reifung der T- und B-Lymphozyten verhinderte und somit einen schweren, kombinierten Immundefekt (*severe combined immunodeficiency, SCID*) herbeiführten, sodass die implantierten, humanen Zellen ungehindert proliferieren konnten. Diese produzierten humanes Albumin, welches im Serum nachweisbar war und somit als *in vivo* Parameter zum Fortschritt der Repopulierung herangezogen werden konnte. Insgesamt benötigt dieser Prozess eine Zeitspanne von circa 8-10 Wochen. Immunhistologische Färbungen von humanspezifischen Markern (Cytokeratin 18, Ki-67) ermöglicht die *ex vivo* Beurteilung von Lebergeweben hinsichtlich des Standes der Repopulierung. Die Mäuse wurden dann intraperitoneal mit dem HB-Virus inokuliert und es zeigte sich, dass über mehrere Wochen in den nun vorhandenen, humanen Hepatozytenclustern eine natürliche und produktive Infektion mit Bildung von cccDNA etabliert werden konnte (siehe Abbildung 1.2). Die Viruslast der Versuchstiere erreichte dabei bis zu 10^9 Kopien/ml. (M Dandri et al., 2001; Maura Dandri & Petersen, 2012; Lütgehetmann et al., 2011).

In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Studien mit Hilfe der uPA/SCID- Mäusen durchgeführt. Es zeigte sich beispielsweise, dass das Nukleosidanalogon Lamivudin,

welches primär zur Therapie der HIV-Infektion eingesetzt wurde, auch in HBV-infizierten uPA/SCID-Mäuse starke, antivirale Effekte hat (Tsuge et al., 2005).

In den letzten Jahren kam es auch in Hinblick auf neue therapeutische Ansätze zu in vivo Studien an uPA/SCID- Mäusen, wobei durch den Einsatz moderner CAM (*capsid assembly modulator*; NVR 3-778, Bay 41-4109) ein Effekt auf die Viruslast im Serum der Mäuse nachgewiesen werden konnte (Brezillon et al., 2011; Klumpp et al., 2018).

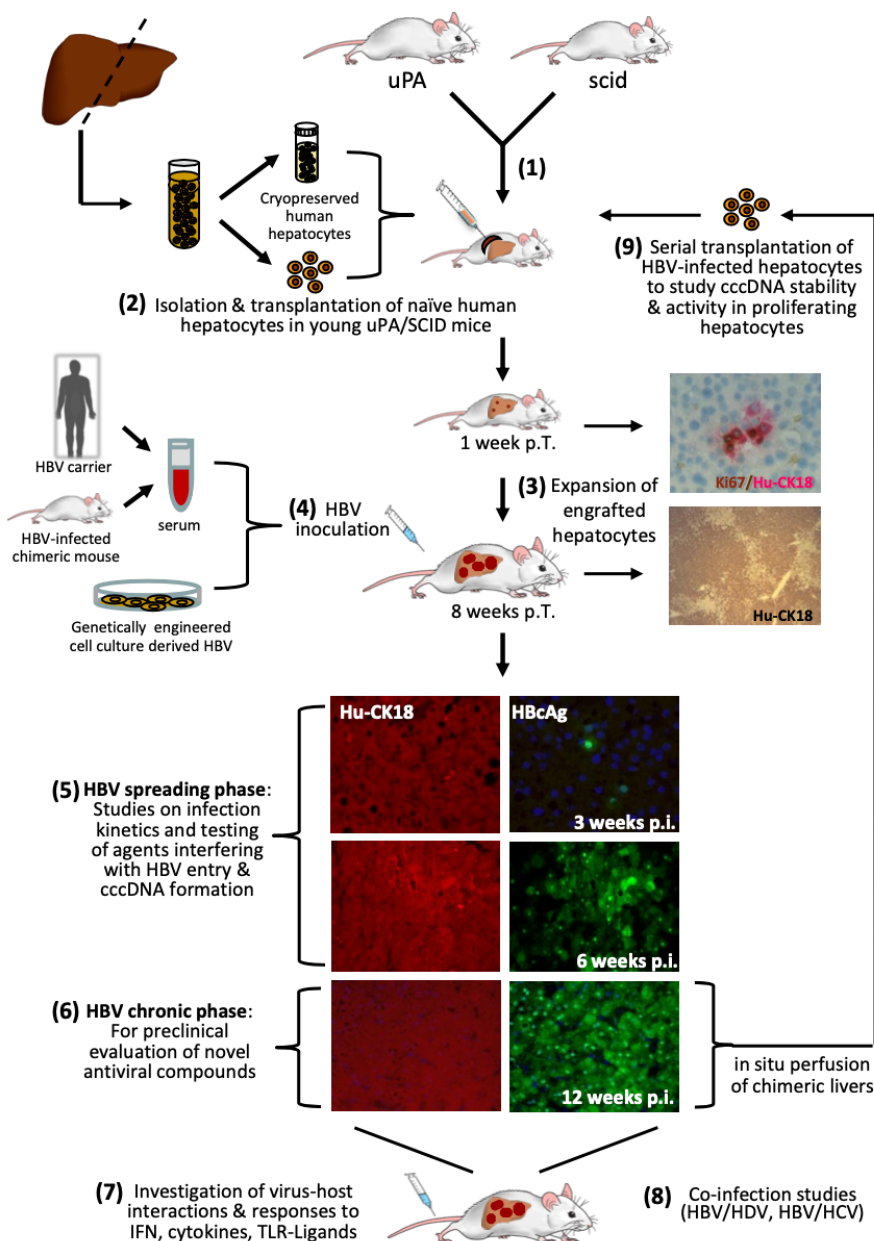


Abbildung 1.2 – Das UPA/SCID Mausmodell

Schematische Darstellung (englisch) des in dieser Arbeit angewandten Mausmodells. Nach der Transplantation von humanen Hepatozyten in junge UPA/SCID Mäuse kommt es zu einer Expansion der menschlichen Zellen. Acht Wochen später werden die Mäuse mit dem Hepatitis B Virus infiziert. Nach der Ausbreitungsphase des Virus geht die Erkrankung in eine chronische Phase über. Abbildung entnommen aus: Dandri, M., Petersen, J., Chimeric Mouse Model of Hepatitis B Virus infection, Journal of Hepatology (2011)

1.5 MicroRNA

MicroRNA (miRNA, miR) wurden an Hand des *lin-4* Proteins im Modellorganismus *c. elegans* erstmalig im Jahre 1993 beschrieben und sind somit eine relativ junge Entdeckung in der Molekularbiologie (Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Es handelt sich um kurze, nicht kodierende RNA-Fragmente, welche die Translation bestimmter mRNAs post-transkriptional über gezielte *antisense*-Bindungen blockieren bzw. inhibieren können. Dabei binden sie gemeinsam mit einem Protein der Argonauten-Familie an die 3' untranslatierte Region (UTR) ihrer Ziel-mRNA. Sie sind somit entscheidend an der Genregulation beteiligt, beeinflussen die Translation von bis zu 30% der menschlichen, Protein-kodierenden Gene und sind außerdem über die Speziesgrenzen hinweg hochgradig konserviert (Bartel, 2004).

In den folgenden Jahren wurden stetig mehr microRNA in zahlreichen Organismen identifiziert und aufsteigend, nach Zeitpunkt der erstmaligen Sequenzierung nummeriert. Die Erforschung der regulatorischen Funktionen der microRNAs führte schließlich im Jahre 1998 zum erstmaligen Einsatz synthetischer microRNAs, die gezielt die Translation bestimmter mRNA blockieren konnten. Dieses Verfahren imitiert den natürlichen Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) und wurde 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin geehrt (Fire et al., 1998).

2005 wurde dieses Prinzip noch weitergeführt, indem durch eine Forschergruppe aus den USA künstliche Oligonukleotide eingesetzt wurden, um bestimmte micro-RNAs gezielt in ihrer Funktion zu hindern – microRNA *knock-out* Modelle waren damit durchführbar geworden. Die sogenannten „*Antagomirs*“ wurden den Versuchstieren intravenös injiziert. Es zeigte sich beispielsweise, dass die Antagonisierung der leberspezifischen miR-122 den Cholesterinstoffwechsel signifikant beeinflusste (s.u.) (Krützfeldt et al., 2005).

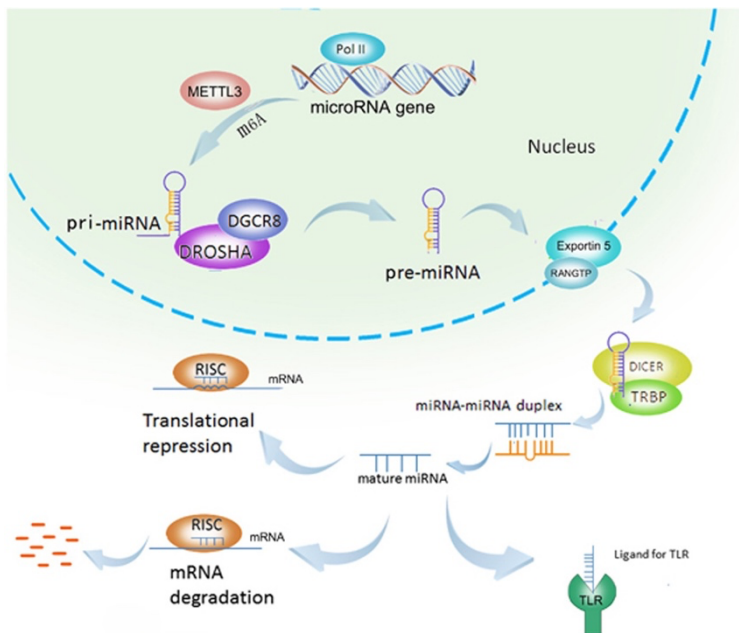


Abbildung 2 – **Synthese und Funktion von microRNA**
 Schematische Darstellung der Synthese und Funktion von microRNA. Nach Formation des *miRNA-induced silencing complex* (RISC) kann es – je nach Anzahl der Bindungspaare an der Ziel mRNA - zu deren Abbau oder Inhibierung der Translation kommen (Internetquelle 3. Entnommen aus „Nature“ - Peng et al., 2016).

Die potenziellen Funktionen und Einflussnahmen der microRNA-Moleküle stellen sich also mannigfaltig dar und Arbeiten darüber können mitunter sehr spezielle Aspekte der Physiologie beleuchten. So schlagen einige aktuelle Arbeiten die Implementierung spezifischer microRNA als laborchemische Marker vor. Nennenswert ist hier zum Beispiel eine spanische Veröffentlichung in *New England Journal of Medicine*, in der eine hochgradig spezifische Korrelation

zwischen hsa-miR-Chr8:96 und dem Nachweis einer akuten, viralen Myokarditis festgestellt werden konnte (Blanco-Domínguez et al., 2021).

Das ohnehin schon komplexe Feld der microRNA wird nach neueren Erkenntnissen sogar noch durch ein Netzwerk aus *competing endogenous RNA* (ceRNA) ergänzt, welche wiederum kompetitiv an microRNA bindet und deren Aktivität hemmt / reguliert (N. Yang, Liu, Yang, & Gao, 2021).

Nach der Entdeckung von microRNA in den frühen 90er Jahren wuchs auch die Anzahl der Möglichkeiten zum Nachweis dieser. Die flüchtigen Moleküle sind anfällig für den Abbau durch RNAsen – das erfordert die stetige Kühlung und ggf. den Einsatz von RNase-Inhibitoren bei der Extraktion. Aktuell stehen mehrere Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung zur Verfügung:

1. *Real-Time-PCR* der microRNA, nachdem diese enzymatisch in die stabilere cDNA-Form transkribiert wurde.
2. *In-situ*-Hybridisierung mittels spezifischer Antagomirs, welche an fluoreszierende Sonden gekoppelt sind.

3. micro-Arrays, mit Hilfe derer die gleichzeitige Auswertung zahlreicher microRNA-Spezies vollbracht werden kann.

(Zur Anwendung kamen in dieser Arbeit Nr. 1 und 2, siehe **Material und Methoden**)

1.5.1 microRNA und HBV

Eine chinesische Studie aus dem Jahr 2017 identifizierte mittels *deep-sequencing* Verfahren eine microRNA, welche sich im hoch konservierten HBsAg *open-reading-frame* befindet (HBV-miR-3) und im Rahmen von Zellkulturversuchen tatsächlich nachgewiesen werden konnte. Auch im Blutserum von Patienten wurde im Rahmen der Studie HBV-miR-3 nachgewiesen; hierbei bestand eine positive Korrelation mit der gleichzeitig erhobenen HBV-DNA Menge im Serum. Als möglicher Effekt dieser microRNA wurde eine Regulierung der Replikation postuliert mittels Bindung an das 3,5kB-Transkript. (X. Yang et al., 2017)

1.5.2 miR-122

Eine Beschreibung der microRNA-122 wurde zum ersten Mal im Jahr 2002 veröffentlicht. Damals identifizierte eine Arbeitsgruppe aus Göttingen durch gewebsspezifische Klonierung an Mäusen 34 neue microRNAs, welche innerhalb der Vertebraten hoch konserviert schienen. MiR-122 stach dabei hervor, weil sie ausschließlich in der Leber nachweisbar war und zudem dort mit 70% den Großteil aller intrazellulären microRNAs ausmachte (Lagos-Quintana et al., 2002). Interessanterweise war die der neuen microRNA-122 zugeordnete Nukleotidsequenz schon 16 Jahre zuvor beschrieben worden - und hierbei findet sich bereits eine auffällige Verbindung zum Hepatitis B Virus: Möröy et al. erforschten 1986 die Entstehung hepatozellulärer Karzinome (HCC) an amerikanischen Waldmurmeltieren (engl. *woodchuck*), die mit dem WHV chronisch infiziert waren. Sie beobachteten dabei eine bemerkenswerte Translokation eines bis dato unbekanntes, nicht-Protein kodierenden Gens, welches *hrc* (*histidine rich calcium binding protein*) benannt wurde, vor das zweite Exon im *c-myc* Onkogen. Diese Translokation verursachte eine bis zu 50-fach stark gesteigerte Expression des Onkogens *c-myc* und verringerte die Menge des eigentlichen (bis dato unbekanntes) *hrc*-RNA Transkriptes. Das Zusammenspiel aus beiden Effekten, bzw. das Ungleichgewicht beider Transkripte (stark erhöhte *c-*

myc Aktivität, verringerte *hrc* Expression) wurde daher mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht (T Möröy et al., 1989; T Möröy et al., 1986). Der Arbeitsgruppe war damals nicht bekannt, dass das neu entdeckte Gen *hrc* der pri-miR-122 entspricht, den Vorläufer der hepatischen microRNA-122. In der Zusammenschau erklärt dies möglicherweise zum Teil, warum niedrige Mengen miR-122 in hepatozellulären Karzinomen mit einer schlechteren Prognose einhergehen (Coulouarn, Factor, Andersen, Durkin, & Thorgeirsson, 2009). Auch im Serum lässt sich microRNA finden, welche sowohl exosomal als auch frei vorliegen kann. Im Umfeld eines akuten Leberversagens mit ausgeprägtem Zelluntergang bei Schweinen konnte durch Baker et al. ein Anstieg u.a. der freien miR-122 gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden (Baker et al., 2015).

Numerisch stellt miR-122 in adulten, murinen Hepatozyten durchschnittlich etwa 66.000 Kopien pro Zelle – in primären, humanen Hepatozyten sind es sogar 135.000 Kopien pro Zelle (Chang et al., 2004). Über ihre genauen Funktionen wird gemeinhin kontrovers diskutiert, da bereits Hinweise auf mehrere Funktionen detektiert werden konnten. Es zeichnet sich ein komplexes Netzwerk aus regulatorischen Pfaden ab, welches im Ganzen noch nicht aufgeklärt werden kann und hier nur exemplarisch beleuchtet werden soll. Möglicherweise sind sämtliche metabolischen Funktionen der Hepatozyten auch in Zusammenhang und Abhängigkeit mit der Expression von miR-122 zu betrachten.

- Eisenstoffwechsel:

Eine Arbeitsgruppe aus Heidelberg konnte nachweisen, dass in mittels anti-miR-122 LNA (*locked nucleic acid*) depletierten Mäusen ein Eisenmangel auftritt. Dieser trat sowohl in Serum als auch in der Leber auf und führte zur typischen Befundkonstellation einer verminderten Hämatopoese und zusätzlicher, extramedullärer Erythropoese. Es wurde dargestellt, dass miR-122 die mRNA des *hamp*-Gens bindet (und inhibiert), welches für das Protein Heparin kodiert. Folglich könne bei verminderter miR-122 Aktivität eine erhöhte Menge Heparin für den erwähnten Eisenmangel verantwortlich sein (Castoldi et al., 2011).

- Tumorsuppressor:

Durch die Arbeit einer US-amerikanischen Forschergruppe an mit HCC-Zellkulturen (HepG2, Hep3B, SK-Hep-1) konnte ein Effekt der miR-122

Expression *in vitro* auf Tumorcharakteristika detektieren. So zeigten die miR-122 exprimierenden Tumorzellen im Vergleich einen weniger aggressiven, epithelialen Phänotyp. In diesem Zusammenhang wurden die mRNA der Proteine ADAM10 (*adistintegrin and metalloprotease family 10*), *serum response factor* (SRF), und *insulin-like growth factor 1* Rezeptor (Igf1R), welche allesamt als proliferationsfördernd bezeichnet werden können, als Ziele der miR-122 identifiziert. Noch darüber hinaus wurde in derselben Studie ein reduziertes Überleben von HCC-Tumorzellen unter Sorafenib festgestellt werden, sofern diese Zellen miR-122 exprimierten, was eine Sensibilisierung der Tumorzellen durch miR-122 gegenüber therapeutischen Medikamenten suggeriert (Bai et al., 2009).

- Lipidstoffwechsel:

Bereits eine frühe Studie aus dem Jahr 2006 untersuchte die Auswirkung von einer hepatischen miR-122 Inhibition auf den Lipidstoffwechsel. Die Forschergruppe aus Kalifornien um Esau et al. zeigte im Versuch mit Mäusen, dass es unter verminderter Menge miR-122 kurzfristig zu einer geringeren, intrahepatischen Cholesterin- und Fettsäuresynthese kam. Folglich zeigten sich niedrigere Plasmaspiegel des Cholesterin (Esau et al., 2006). Weitergehende Studien aus dem Jahr 2012 untersuchten jedoch die langfristige Wirkung einer miR-122 Inhibition im Rahmen von *in vivo* Mäusen und entdeckten, dass es hierunter eher zu einer Steatohepatitis, Inflammation mit konsekutiver Fibrose und Bildung von HCC-ähnlichen Tumoren kommt. Interessanterweise wirkte sich eine erneut induzierte Expression von miR-122 in den erkrankten Mäuselebern wiederum günstig auf den Krankheitsverlauf aus (Hsu et al., 2012; Tsai et al., 2012).

- Hepatitis C:

Das Zusammenspiel bzw. die Wirkung von miR-122 auf das HCV-Genom stellt eine Besonderheit dar: Während microRNA im Rahmen ihrer normalen Funktion an die 3' UTR einer mRNA binden und diese damit in ihrer Translation vermindert, interagiert speziell miR-122 mit zwei Bindungsstellen in der 5'-UTR des HCV-Genoms. Hierdurch wird die Replikation des Hepatitis C-Virus verstärkt und der virale Lebenszyklus beschleunigt (Kunden, Khan, Ghezalbash, & Wilson, 2020). Nicht nur die beschleunigte Replikation stellt eine Belastung für die Wirtszelle dar, zusätzlich scheint durch die einmalige Bindung

zwischen HCV-Genom und miR-122 eine Sequestrierung letzterer in der betroffenen Zelle zu bewirken. Durch die verminderte Anzahl miR-122-Moleküle treten zusätzlich zur viralen Last somit auch o.g. negative metabolische Effekte ein (Luna et al., 2015).

- Hepatitis B:

Als vorherrschende, hepatische microRNA ist auch miR-122 in den Replikationszyklus bzw. die Pathogenese des Hepatitis B Virus involviert. Aktuell ergeben sich jedoch in Zusammenschau verschiedenster, wissenschaftlicher Arbeiten hinsichtlich der exakten Rolle des microRNA-Moleküls widersprüchliche Annahmen:

So konnte eine Arbeitsgruppe aus Peking eine signifikant niedrigere Menge miR-122 in den Lebern HBV-infizierter Patienten detektieren und postuliert in einer Folgestudie die Sequestrierung von miR-122 durch virale mRNA (ähnlich wie bei HCV). Darüber hinaus wird eine negative Korrelation von miR-122 Menge und HCC-Formation *in vivo* beschrieben, passend zu eingangs beschriebener Tumor-Supressor-Hypothese. Hierfür wird die Deregulierung eines Onkogens (*PTTB-binding-factor*, PBF) als möglicher Regulierungspfad beschrieben (Li et al., 2013).

Außerdem wurde in HBV-infizierten Patienten eine positive Korrelation zwischen HBV-DNA und HBsAg mit miR-122 im Serum nachgewiesen (Waidmann et al., 2012).

In Zusammenschau ergibt sich literaturbasiert keine eindeutige Erkenntnis zur Rolle der miR-122 im Rahmen einer HBV-Infektion, insbesondere in der Forschung mit chimären Mäusen wurde bisher keine Studien zur microRNA-Expression oder microRNA-*in-situ*-Hybridisierung veröffentlicht.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die Forschung an microRNA stellt insgesamt ein junges Forschungsfeld der molekularen Medizin dar. Das über microRNA generierte, komplexe System aus Inhibition und Verstärkung von Proteinsynthese ist ein wichtiges Puzzlestück im noch unvollständigen Verständnis der viralen Hepatitiden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss viraler Hepatitiden auf die Produktion von microRNA in Hepatozyten zu charakterisieren.

Das in dieser Arbeitsgruppe etablierte Mausmodell beruht auf einer chimären Leber aus Zellen der Hausmaus (*mus musculus*) und Hepatozyten des Menschen (*homo sapiens*), was bei der Erforschung von (hochkonservierten) microRNA eine genaue Zuordnung zu einer der Spezies erschwert.

Es ergeben sich daher folgende Arbeitsschritte:

1. Die Etablierung neuer Methoden (Amplifizierung, rtPCR, FISH) zur Quantifizierung und Visualisierung von microRNA in chimären uPA/SCID-Mäusen mit viraler Hepatitis.
2. Validierung der Messverfahren in Bezug auf die Expression von miR-122 unter Hepatitis C Infektion (hier besteht eine sichere Datenlage über die Wechselwirkung zwischen miR-122 und HCV, jedoch nicht im Bereich der Maus/Mensch-chimären Lebern).
3. Abschließend die Untersuchung der Expression von miR-122 in den Lebern/Seren der Versuchstiere insbesondere mit Hinblick auf die chimären Lebern.

2 Material und Methoden

2.1 Maus-Modell und Probengewinnung

Die UPA (*urokinase-type-plasminogen-activator*) transgenen Mäuse (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) wurden entsprechend hausinternem Standard in pathogenfreier Umgebung gehalten und mit SCID (*severe combined immuno deficiency*) /beige Mäusen (Taconic Farms, Hallingore, Dänemark) gekreuzt. Die Expression des uPA-Transgens, sowie die Erhaltung des SCID-Phänotyps wurden dabei engmaschig kontrolliert. Im Verlauf wurden drei bis vier Wochen alte, homozygote uPA SCID/beige Mäuse mit Isofluran betäubt, im Anschluss wurden die aufgetauten, humanen Spenderhepatozyten intrasplenisch injiziert. Der Fortschritt der Repopulierung mit den Humanen Zellen wurde anhand der Menge von humanem Albumin im Serum der Mäuse eingeschätzt (ELISA; Bethyl Laboratories, Biomol GmbH, Hamburg). Nach circa acht Wochen war bei einer Menge von >2mg/ml Humanalbumin im murinen Serum von einer hinreichenden Repopulierung auszugehen. Es folgte die Infektion mit Hepatitis B (respektive C, D, E) – Viren, wobei nach etwa weiteren acht Wochen eine produktive Infektion generiert war. Hiernach wurden die Tiere getötet, die Lebern entnommen und in Isopentan gefroren, anschließend bei -80°C konserviert.

Als Kontrollgruppe dienten nicht-infizierte uPA/SCID Mäuse aus derselben Haltung. Der Vorgang wurde durch das Ethikkomitee der Stadt Hamburg genehmigt und entspricht den Vorgaben der Erklärung von Helsinki (Lütgehetmann et al., 2012).

2.2 Anreicherung/ Extraktion der Micro-RNA

Die microRNA wurde aus Mäuselebern respektive Serumproben gewonnen, die nach der Entnahme des Versuchstiers sofort bei -80 °C kryokonserviert wurde. Den gefrorenen Organen wurden ca. 5 mg entnommen und diese mit Hilfe des Qiagen® miRNeasy Micro Kit weiterbearbeitet. Dabei wurden die Proben in 700 µl QIAzol Lyse-Reagenz gelöst und mit einem Kunststoff-Stößel gänzlich zerstoßen. Gemäß Protokoll wurden anschließend 140 µl Chloroform hinzugefügt und die Probe für 15 min bei 12,000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die oben aufliegende, wässrige Phase wurde dann in ein anderes Gefäß transferiert und mit 525 µl Ethanol (100 %) versehen.

Im Falle der Serum Proben wurde das entsprechende Qiagen® Serum/Plasma Kit angewandt. Hierbei wurden jeweils ca. 50 µl Serum in den Extraktionsprozess überführt und in 250 µl QIAzol Lyse-Reagenz gelöst und durch Vortex vermischt. Nun wurde die zur Quantifizierung der Ergebnisse benötigte Spike-microRNA (cel-miR-39b; 7,4 pMol) in die Reaktionsgefäße hinzugefügt, anschließend durch 50 µl Chloroform ergänzt und für 15 min bei 12,000 g bei 4 °C zentrifugiert. Analog zur Extraktion aus Gewebe wurde nun die wässrige Phase von ca. 150 µl entnommen und mit 225 µl Ethanol (100%) versehen.

Die Gemische wurde in beiden Fällen (Extraktion aus Gewebe und aus Serum) entsprechend den Herstellerangaben sukzessive durch mehrere Filtersäulen zentrifugiert, abschließend die gewonnene Menge RNA in 20 µl verdünnt und sofort bei -80 °C gelagert. Für detaillierte Ansichten des Prozesses ist der Einblick in die Herstellerprotokolle möglich (Internetquelle 2).

2.3 cDNA-Synthese und Amplifikation

Von o.g. Proben wurde eine 1:100 verdünnte Lösung hergestellt und diese jeweils in das TaqMan™ Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit überführt. Jedes Reaktionsfeld mit 2 µl enthielt somit eine gesamt RNA-Menge von 1-10 ng, wie für den Assay vom Hersteller vorgesehen.

Entsprechen dem Herstellerprotokoll nahmen wir konsekutiv die 3' poly[A] tailing – Reaktion, die 5' Adapter Ligation – Reaktion, die reverse Transkription, sowie die eigentliche Amplifikation vor.

Für die zyklischen Verfahren wurde der ThermoFisher™ Veriti® 96-Well Thermal Cycler genutzt.

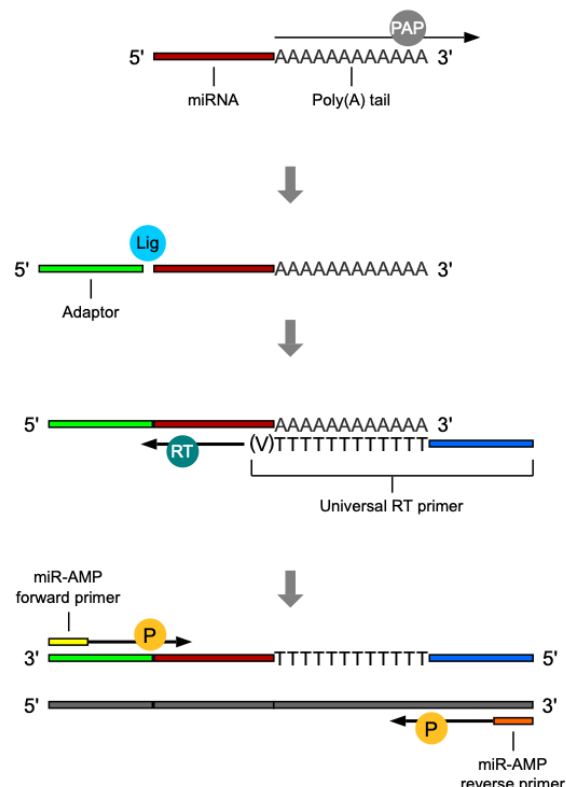


Abbildung 3 – **cDNA Synthese aus microRNA**
 Funktionsweise der microRNA -Umschreibung in cDNA und anschließender Amplifizierung aus dem Benutzerhandbuch des TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit. Katalog-Nr: A25576. Publikationsnummer : 100027897. Revision C

2.4 TaqMan® Advanced miRNA Assay

Die microRNA-Expression wurde über den bei Erstellung dieser Experimente neuartigen TaqMan™ Advanced miRNA Assay bestimmt. Hierfür wurden die (amplifizierten) cDNA-Proben abermals 1:10 in H₂O verdünnt und in die PCR-Mischung überführt. Diese setzte sich aus 5 µl des TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 2,5 µl H₂O, 2 µl cDNA (wie oben beschrieben 1:10 verdünnt), sowie 0,5 µl des jeweiligen TaqMan® Advanced miRNA Assay als PCR – Primer. Somit ergab sich pro Reaktionsfeld im Cyclor ein Volumen von 10 µl.

Für den Assay nutzten wir ein ViiA7 Real-Time PCR System, Life Technologies. Zur relativen Quantifizierung wurden die Expressionsniveaus (Cycle-Threshold) gegen die Housekeeping microRNA miR-26b normalisiert, wie vom Hersteller ThermoFisher empfohlen (siehe Ergebnisteil).

2.5 Affymetrix viewRNA miRNA ISH Assay

Um hinsichtlich der hoch-konservierten microRNA zwischen den Spezies auf der Ebene einzelner Zellen differenzieren zu können, war ein Ansatz über *in-situ* Hybridisierung erforderlich, da mittels PCR nur ein Lebergemisch aus humanen und murinen als Ganzes untersucht werden konnte.

Die durch den Hersteller dieses Assays vorgegebenen Arbeitsanweisungen waren jedoch für die Anwendung in Zellkulturen optimiert – eine Anwendung in Gewebeschnitten war noch nicht entwickelt bzw. freigegeben worden. Daher entwickelten und veränderten wir das gegebene Protokoll weiter, um es für unsere Zwecke zu optimieren.

Das nachfolgende Protokoll lässt sich in 2-3 Arbeitstage unterteilen. Am ersten Tag werden die Leberschnitte mit Hilfe eines Kryotoms angefertigt, jeweils zu zweit auf einen Glas-Objektträger aufgetragen und über Nacht in 4% Paraformaldehyd bei 4 °C gelagert und fixiert. Die Versuche haben gezeigt, dass auch mit Gefrierschnitten, die bereits über lange Zeit – bis hin zu mehreren Jahren - eingelagert waren und nicht frisch hergestellt wurden gute Arbeitsergebnisse erzielt werden, sofern die durchgängige Kühlung bei -80 °C gewährleistet war.

Am zweiten Arbeitstag wurde mit dem Vorheizen des Ofens auf 40 °C und dem Auftauen der gefrorenen Sonden-Sets in einer Eiswanne begonnen. Die Sonden wurden von der Firma Affymetrix nach unseren Anforderungen produziert und zugestellt. Im Verlauf wurde jeder Schnitt mit zwei unterschiedlichen Sonden behandelt – jeweils in der Lage ein spezifisches Ziel zu binden.

Die Leberschnitte wurden zunächst gemeinsam in einer Küvette mit PBS dreimal für jeweils drei Minuten gewaschen und unter Zuhilfenahme von Aceton für zwei Minuten entfettet. Im Anschluss erfolgte nochmals ein Waschschriff mit drei mal drei Minuten. Danach wurde eine hydrophobe Markierung um die Schnitte auf dem Objektträger gezogen, um den Abfluss der Reagenzien vom Objektträger zu verhindern. Es wurde dabei genau darauf geachtet, die Gewebe nicht zu berühren.

Als nächstes wurde das Protein *cross-linking* durchgeführt. Dafür benetzten wir die Präparate mit 100 µl des mitgelieferten *cross-linking-buffer QM* und ließen sie für 10 min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend wurde der überstehende Puffer entfernt und die Behandlung mit dem Puffer noch einmal wiederholt.

Nebenher bereiteten wir eine Lösung aus 33,75 mg EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) in 5ml *cross-linking-buffer QM* vor und trugen von dieser dann jeweils 200 µl auf die Präparate auf, nachdem der vorher genutzte Puffer entfernt worden war. Hierunter wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur belassen. Die *cross-linking*-Lösung wurde daraufhin dreifach für jeweils zwei Minuten in eine Küvette abgewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte der Proteinverdau. Dafür wurde die mitgelieferte *Protease QS* im Verhältnis 1:1000 in vorgewärmten PBS (*phosphate buffered saline*, 40 °C) verdünnt und jeweils 200 µl der Lösung auf die Objektträger aufgebracht. Es folgte die Inkubation für 25 Minuten im Ofen bei 40 °C, woraufhin die Lösung zwei Mal für je drei Minuten mit PBS wieder abgewaschen wurde.

Im Anschluss fixierten wir das Gewebe erneut für drei Minuten bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd. Hierbei kann derselbe Ansatz wie zu Beginn des Arbeitsprotokolls verwendet werden. Es folgten drei weitere Waschschriffe in PBS für je drei Minuten.

Als nächstes wurden die aufgetauten Sonden im mitgelieferten *probe set diluent* (vorgewärmt auf 40 °C) im Verhältnis 1:50 verdünnt. Dabei wird ein gemeinsamer Sonden-Mix aus allen Sonden erstellt (Typ 1, rot – microRNA, Typ 4, grün – mRNA). Nachdem das PBS aus vorhergegangenem Schritt abgeschüttelt war, wurde jeder Objektträger mit 100 µl des Sonden-Mix benetzt und anschließend für 2h in der feuchten Ofenkammer bei 40 °C inkubiert. Währenddessen wurde der nun notwendige Waschpuffer hergestellt, bestehend aus den von Affymetrix bereitgestellten Pufferkomponenten 1 (2,4 ml) & 2 (4 ml) mit 793,6 ml destilliertem und nukleasefreiem H₂O.

Nach der Inkubation wuschen wir den Sondenmix dreimal für je zwei Minuten mit dem neu hergestellten Waschpuffer ab. Zu diesem Zeitpunkt ist es möglich, die Proben im Waschpuffer über Nacht bei 4 °C in feuchter Kammer bis zum Folgetag zu lagern.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass es im Folgenden nicht nötig war, für jeden Waschschrift eigens eine Küvette mit dem vorher beschriebenen Waschpuffer zu füllen. Tatsächlich kann der Puffer mit einer Pipette direkt auf die Objektträger aufgebracht werden. Diese sollten dann für die gegebene Zeit geschwenkt und der Puffer im Anschluss abgeschleudert werden, bevor das nächste Agens hinzukommt.

Im nächsten Schritt gaben wir 100 µl des mitgelieferten *pre-amplifier mix QM* (vorgewärmt auf 40 °C) auf die Objektträger, nachdem der Puffer entfernt wurde. Die Objektträger wurden so nochmals für 1 h bei 40 °C im Feuchtofen belassen. Es folgte das dreimalige Abwaschen für je drei Minuten mit dem Waschpuffer in o.g. Weise.

Wieder wurden die Reste des Waschpuffers entfernt und nun 100 µl des vorgewärmten (40 °C) *amplifier mix QM*, welcher Ebenfalls vom Hersteller bereitgestellt wurde, auf die Gewebeprobe aufgetragen. Erneut wurden die Träger bei 40 °C für 1 h im Feuchtofen inkubiert. Nachfolgend wurde das Reagens dreimal für je drei Minuten mit dem Waschpuffer abgespült.

Da von nun an mit den fluoreszierenden Markern gearbeitet wurde, dimmten wir das Raumlicht auf ein Minimum und breiteten zunächst den *label-probe-mix* vor. Hierfür mischten wir den Marker des Typs 1-AP (alkalische Phosphatase) im Verhältnis 1:1500 und den Marker für die Sonden des Typs 4 (Alexa 488) im Verhältnis 1:100 im mitgelieferten *label probe diluent QF*, welches auf 40 °C vorgewärmt wurde. Analog

zum Sondenmix können hier beide Marker in einem Ansatz zusammengeführt werden. Die Mischung wurde kurz gevortext und anschließend je 100 µl auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Diese wurden anschließend für 1 h bei 40 °C im Feuchtofen inkubiert.

Es folgte das dreimalige Waschen für je drei Minuten mit Waschpuffer. Wir entfernten die Reste des Waschpuffers und trugen für 5 Minuten je 100 µl der *AP enhancer solution* auf die Leberproben auf. Währenddessen wurde das *fast red* Substrat vorbereitet, indem ein halbes *fast-red* Pellet in 2,5 ml Naphtol Puffer durch ausgiebiges vortexen gelöst wurde.

Die *AP enhancer solution* wurde entfernt und je 100 µl des *fast red* Substrats auf die Objektträger aufgebracht. Diese wurden nochmals für 45min bei 40 °C im Feuchtofen belassen.

Bei Entnahme der Träger aus dem Ofen, sollte bereits eine rötliche Färbung der Proben deutlich sichtbar sein. Wir wuschen das Substrat zweimal je 3 Minuten mit PBS ab, fixierten die Gewebe bei Raumtemperatur erneut für zehn min in 4% PFA (Paraformaldehyd) und wuschen letzteres dreimal für je drei Minuten mit PBS ab. Zuletzt führten wir eine Kernfärbung mit Hoechst-Reagens durch (1:20.000 in PBS, ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur) und wuschen anschließend zweimal für je drei Minuten mit PBS.

Abschließend sollten die Gewebeschnitte komplett trocknen (möglich auch im Ofen bei 40 °C), bevor sie unter einem Abzug für eine Sekunde in Xylol getränkt wurden. Letzteres löste die hydrophobe Markierung und verbesserte merklich die Qualität der roten Färbung (Alkalische Phosphatase). Einzelne Signale waren klarer zu erkennen, es gab weniger flächige, unspezifische Färbungen.

Nachdem das Xylol gänzlich verdunstet war, bestückten wir die Objektträger mit Glasplättchen, dafür benutzten wir DAKO *fluorescent mounting medium*.

Tabelle 1 - **viewRNA Sonden**

Gen	Affimetrix Name	Assay-Nummer	Kanal / Farbe
HDV - taylor	HDV genome	Individuell hergestellt	Alexa 488 / grün
HDV - patient	HDVgenotype1_patient	Individuell hergestellt	Alexa 488 / grün
HEV	HEV orf3	Individuell hergestellt	Alexa 488 / grün
HBV	Hepatitis B Core	Individuell hergestellt	Alexa 488 / grün
HCV	HCV mouse_5376	Individuell hergestellt	Alexa 488 / grün
B2M	Human B2M	Individuell hergestellt	Alexa 488 / grün
miR-122	miR-122	VM1-99999-01	Alexa 546 / rot

2.5.1 Variation mit Affymetrix viewRNA miRNA ISH PLUS Assay

Zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit war die Verwendung eines neu veröffentlichten Produkts der Firma Affymetrix möglich. Hierbei wurde der AP-basierte Farbstoff als Marker für die Typ 1 microRNA Hybridisierung durch eine rot fluoreszierende Sonde (Alexa 546) analog zum Typ 4 (Alexa 488) ersetzt. Dies vereinfachte das Protokoll, in dem die Anwendung von *AP enhancer* und *fast-red* Substrat entfielen. Ebenfalls war keine abschließende Reinigung der Objektträger in Xylol mehr nötig, womit auch die Arbeitszeit unter einem Abzug minimiert werden konnte. Gleichzeitig präsentierten sich die Fluoreszenzsignale im roten Kanal punktueller und mit weniger Verwaschungseffekten, als es beim enzymbasierten Färbungsverfahren der Fall war.

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden durchgeführt mit:

KEYENCE *HS All-in-one Fluorescence Microscope* "BZ-9000E"

2.6 **Graph Pad Prism**

Für die graphische Darstellung und Erstellung der Abbildungen in dieser Arbeit wurde das Programm Graph Pad Prism (© GraphPad Software, LLC) in der Version 8.3.0 für MacOS verwendet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls mit o.g. Software.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Expression von microRNA in chimären UPA/SCID-Mauslebern mittels rtPCR

Die erste Stufe dieser Arbeit beinhaltete zunächst eine umfangreiche Etablierung von microRNA-bezogenen Techniken in der bestehenden Arbeitsgruppe. Zwar waren im Rahmen bisheriger Projekte unzählige Extraktionen von RNA aus Lebergewebe durchgeführt worden, jedoch wurden diese mit dem Ziel der mRNA-Analyse durchgeführt und hierbei war nicht von ausreichender Konservierung der microRNA auszugehen. Im Rahmen bisheriger Studien der Arbeitsgruppe war bereits eine umfangreiche Sammlung von Versuchsobjekten asserviert worden. Es handelte sich dabei vor allem um Proben muriner Lebern, Seren, Milzen aber auch humanen Lebergewebes (vornehmlich aus explantierten Lebern). Die Objekte wiesen aufgrund der Umstände Ihrer Konservierung unterschiedliche Eigenschaften auf. Im Wesentlichen ließen sie sich gemäß folgenden Eigenschaften einteilen:

- Ursprung der Probe
 - Lebergewebe
 - Milzgewebe
 - Serumprobe
- Spezies
 - Murin
 - Human
 - Hybrid
- Infektion
 - Hepatitis B
 - Hepatitis C
 - Hepatitis D
 - Hepatitis E
 - Nicht-infiziert

3.1.1 Etablierung eines Messverfahrens mit rtPCR

Wir wählten aus o.g. Gruppen zunächst eine Aufstellung acht Leberproben aus infizierten und nicht-infizierten UPA/SCID Mäusen, um das Verfahren der microRNA-Extraktion und Amplifizierung zu validieren. Von letzterem versprachen wir uns eine bessere Sensitivität bei der Auswertung mittels Real-Time PCR (rtPCR) in Hinblick auf die geringen Mengen der nachzuweisenden microRNA. Von den gewählten Lebern wurden jeweils zwei Proben getrennt bearbeitet (siehe Suffix /1 bzw. /2 in der Probennummer), daraus ergab sich die Gesamtmenge von 16 Datenpunkten pro Gruppe. Aus diesen Proben wurde microRNA extrahiert und die miR-122 mittels rtPCR **ohne** vorherige Amplifikation quantifiziert. Es zeigte sich ein medianer *cycle-threshold* (CT) von 32,3. Im zweiten Schritt wurde die microRNA aller Proben gemäß o.g. Protokoll amplifiziert und die rtPCR erneut durchgeführt. Diese Messung ergab nun für die miR-122 einen medianen CT von 21,5. Somit konnte von ein einer erfolgreichen Vervielfachung der gesamten microRNA Menge um circa Faktor 1000 ausgegangen werden. Grundsätzlich entspricht die Änderung um 3,33 CT einer Verzehnfachung der Ausgangsmenge. Dementsprechend bei einer medianen Abweichung von 10,8 CT ca. 10^3 (CT-Differenz median 10,8; $p=0,0003$; siehe Abb. 4).

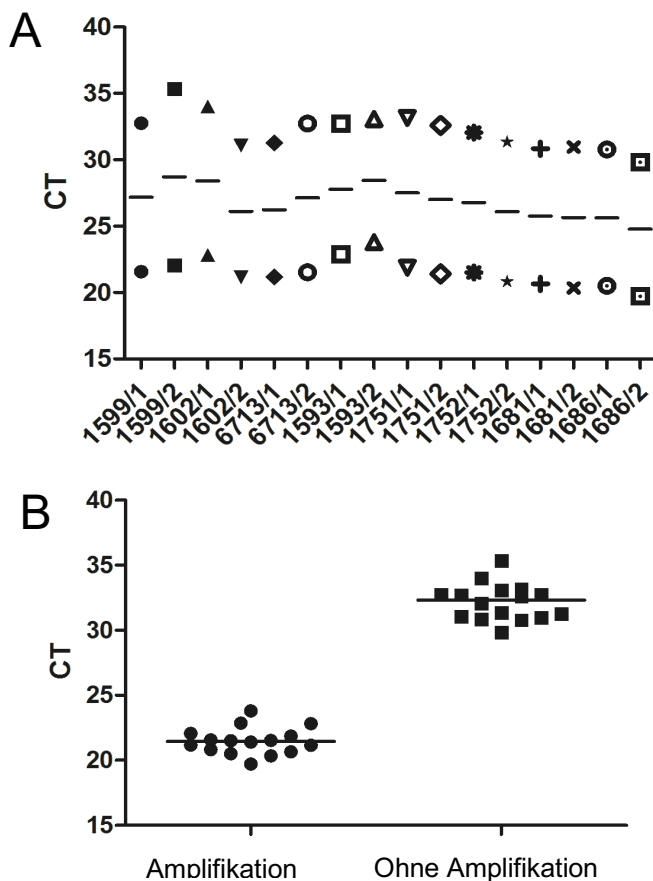


Abbildung 4 – Amplifikation von microRNA aus murinen Lebern

A – Dieses Diagramm listet auf der x-Achse Leberproben (n=16) verschiedener Versuchsmäuse auf. Dabei gibt die vierstellige Zahl die Mausnummer an. Es wurden acht verschiedene Mäuse untersucht, von denen jeweils zwei Leberproben verarbeitet wurden (Suffix 1 bzw. 2 der Mausnummer). Auf der y-Achse der CT-Wert (*cycle threshold*) für die miR-122-realttimePCR. Die untere Reihe Datenpunkte repräsentiert die CT-Werte nach beschriebener microRNA-Amplifikation, die obere Reihe zeigt den CT-Wert derselben Probe ohne vorherige Amplifikation der microRNA.

B – Das Diagramm stellt eine Transposition der Abbildung 4A dar. Die Versuchsproben (n=16) wurden hierbei so angeordnet, dass die *cycle thresholds* (y-Achse, CT) für den miR-122-realttimePCR Assay jeweils mit und ohne Amplifikation (x-Achse) in einer Punktwolke angeordnet sind. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied der CT-Werte beider Gruppen (CT-Differenz median 10,8; $p=0,0003$).

Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch bei Anwendung in vier humanen Leberbiopsien anhand dreier verschiedener microRNA (miR-122, miR-144, let-7) reproduzieren. (Abb. 5). Die Biopsien stammten aus humanen NASH bzw. ASH-Lebern. Im Falle einer der Biopsie (No.80) lag die Menge der microRNA-122 vor Amplifizierung unterhalb der Nachweisgrenze. Die Menge der microRNA-144 lag ohne Amplifizierung in allen Proben unter der Nachweisgrenze und wäre damit ohne dieses Verfahren nicht aus- und verwertbar gewesen. Es zeigte sich somit die Überlegenheit der Amplifizierung durch größere Sensitivität. Weitere Versuche mit o.g. humanen Proben wurden nicht durchgeführt. Die Amplifikation der microRNA war zwar eindeutig, jedoch zeigte sich der Faktor für die Vorgänge bei let-7 und miR-122 variabel, sodass nicht von einer erfolgreichen Normalisierung gegen eine Housekeeping Referenz ausgegangen werden konnte.

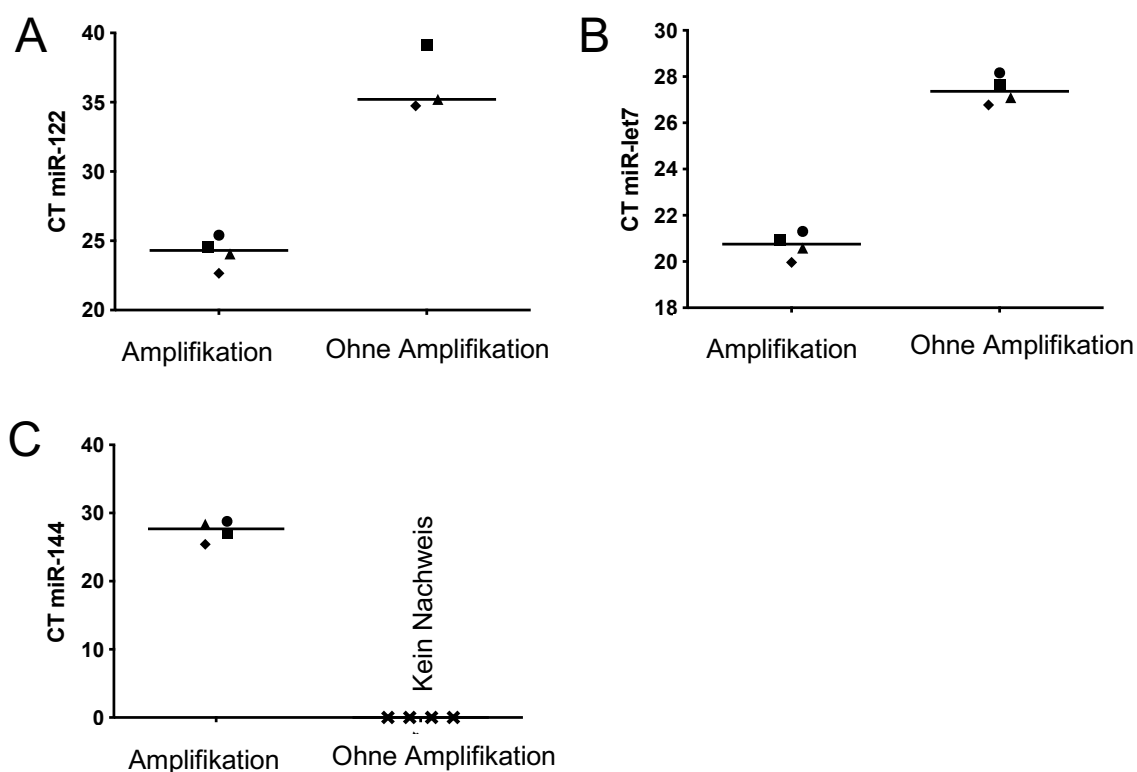


Abbildung 5 – **Amplifikationserfolg bei rtPCR verschiedener microRNA in humanen Leberbiopsien**

Dargestellt wird das Versuchsergebnis einer real-time-PCR verschiedener microRNA in humanen Leberbiopsien (n=4). Auf der y-Achse jeweils der cycle threshold (CT) für den entsprechenden miR-rtPCR-Assay. Auf der x-Achse sind die Messungen in zwei Gruppen aufgeteilt, jeweils mit und ohne vorherige Amplifikation der microRNA. Bei den verschiedenen Symbolen handelt es sich übergreifend um dieselben Proben.

A: miR-122 - Mittlere CT-Differenz $12,19 \pm 1,351$; $p=0,0003$

B: miR-let-7 - Mittlere CT-Differenz $6,727 \pm 0,4176$; $p<0,0001$

C: miR-144 - Medianer CT-Wert: 27,7. Die Kontrollgruppe ohne Amplifikation lag hier unter der Nachweisgrenze.

In o.g. Verfahren ließen sich folglich die relativen Anteile der anwesenden microRNA innerhalb einer Probe (gesamt RNA Extrakt eines Leberfragmentes) gut darstellen und vergleichen. Die angestrebte Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Proben war jedoch nicht gegeben, da sich das Eingangsmaterial nicht vollständig normalisieren bzw. standardisieren ließ: Die für die RNA-Extraktion genutzten Leberanteile variierten in Masse, Zelldichte, Zellverteilung und Zellzahl. Benötigt wurde daher eine stabile Komponente, die über sämtliche Proben hinweg als Parameter zur Normalisierung der gemessenen microRNA-Mengen dienen konnte. Erst dann wäre die Größeneinordnung im Sinne einer relativen Expression möglich. Auf mRNA-Ebene

war arbeitsgruppenintern dafür GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als stabiles „house-keeping“-Gen seit längerem erfolgreich in Anwendung.

Geeignet im Sinne der Zielsetzung konnte dafür nur eine endogene microRNA sein, welche möglichst in allen Zellen beider Spezies (Maus und Mensch) in konstantem, relativem Anteil vorliegt. Somit konnten mögliche Unterschiede in der Gesamtmenge der extrahierten RNA relativiert und Expressionslevel auch zwischen den verschiedenen Proben verglichen werden. Laut Hersteller der TaqMan® Advanced miRNA Assays (ThermoFisher) eignete sich hierfür die microRNA 26b-5p, welche speziesübergreifend gleichmäßig exprimiert würde. In den Testreihen zeigte sich dementsprechend die Expression des Kontrollparameters sehr stabil und auf hohem Niveau.

3.1.2 Messung mehrerer, HBV-assoziiertes microRNA

Mit diesem Messverfahren wurde zunächst eine kleinere Auswahl von solchen microRNAs untersucht, die in großen Mengen von Hepatozyten exprimiert werden oder einen nachweislichen Effekt auf HBV-Progression oder HCC-Formation ausüben: Die drei microRNA miR-122, let7 und miR-199 konnten in großer Anzahl in hepatischem Gewebe nachgewiesen werden und stellen zentrale Regulatoren des hepatischen Metabolismus dar (Hou et al., 2011).

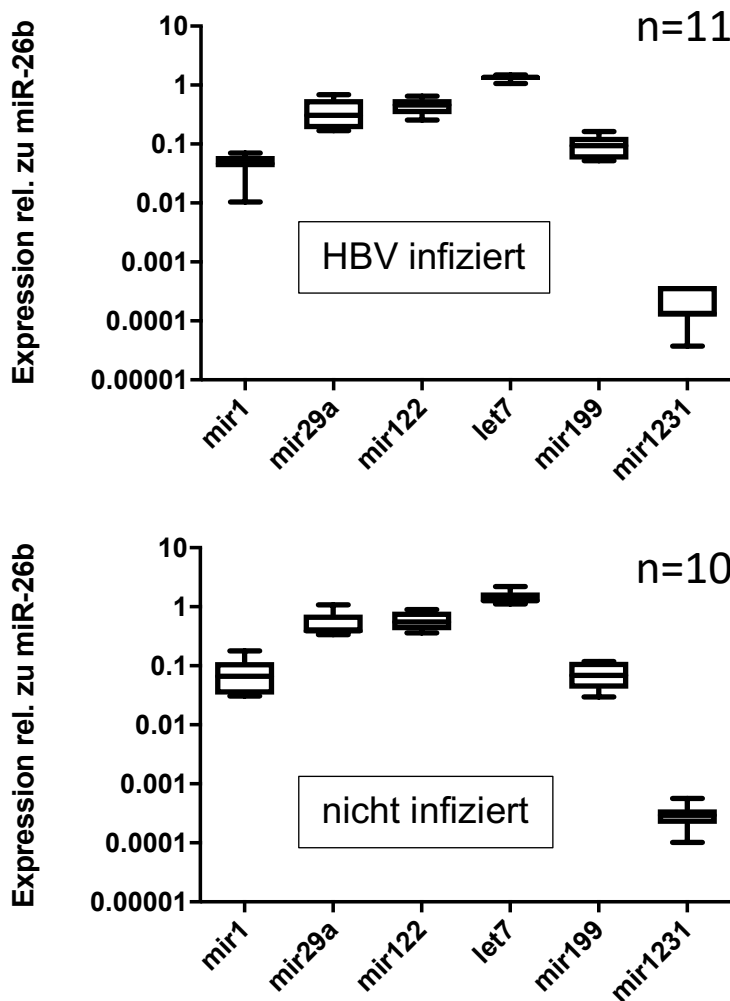
Die Expression der miR-1 wurde als prognostischer Marker der HCC-Formation identifiziert und fungiert mutmaßlich als Tumorsuppressor (Köberle et al., 2013; Wang et al., 2015).

In einer chinesischen Studie an HBx-transgenen Mäusen beobachtete man eine HBx-abhängige Verstärkung der miR-29a (Kong et al., 2011).

MicroRNA-1231 wurde im Rahmen desselben Mausmodells (HBV infizierte, chimäre uPA/SCID-Mäuse) von einer japanischen Arbeitsgruppe untersucht. Es zeigte sich dabei eine verstärkte Expression der miR-1231 in infizierten Tieren (Kohno et al., 2014).

O.g. microRNA wurden aufgrund ihrer vorbeschriebenen Eigenschaften auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Es konnten jedoch im Vergleich zwischen infizierten mit nicht-infizierten Tieren hierbei keinerlei signifikante Unterschiede gemessen werden (Abb. 6). Auffällig war, dass im Gegensatz zur Studie der Kollegen Kohno et al., die mit einem ähnlichen Verfahren arbeiteten, miR-1231 mit Hilfe der Amplifizierung auch in nicht-

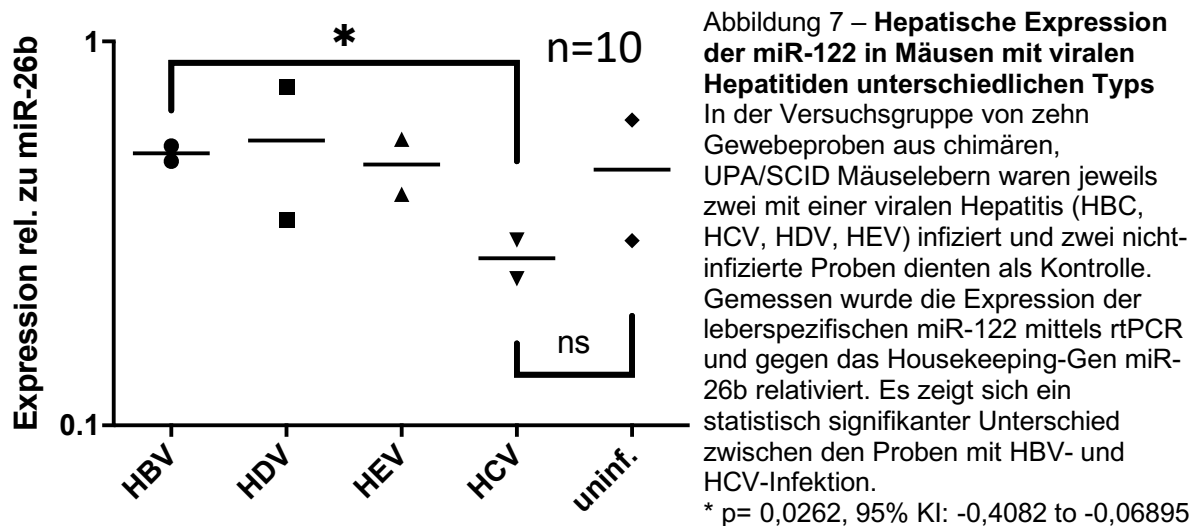
infizierten Lebern nachweisbar war, was die Vorteile unserer Methode aufzeigt. Es ergab sich im hier beschriebenen Verfahren ein niedrig signifikanter Unterschied der Expression von miR-1231 in HBV-infizierten und nicht-infizierten UPA/SCID Mauslebern. Die klinische Bedeutung ist aufgrund der ausgesprochen geringen Dimension fraglich.



3.1.3 Expression von miR-122 in chimären Mauslebern mit unterschiedlichen, viralen Hepatitiden

Der Fokus wurde nachfolgend auf die microRNA-122 gelegt, aufgrund ihrer übergeordneten Bedeutung für den hepatischen Metabolismus und des Vorkommens in Hepatozyten. Anschließend wurde eine Gruppe von 18 Mäusen, welche mit unterschiedlichen Typen von Hepatitiden infiziert waren (6x Hepatitis B, 2x C, 2x D, 2x E und 6x nicht-infizierte Kontrolle), hinsichtlich der Menge an microRNA-122 im

entnommenen Lebergewebe untersucht. Literaturbasiert waren die Angaben zur miR-122 und dem Zusammenhang mit einer HBV-Infektion durchaus widersprüchlich; speziell am hier verwendeten uPA/SCID Mausmodell wurden bezüglich möglicher Effekte der Infektion bis dato keine weiteren, uns bekannten Studien durchgeführt.



Allerdings gab es umfassende Ergebnisse, welche nahelegten, dass eine Hepatitis C Infektion von größeren Mengen miR-122 begünstigt wird und somit im Rahmen einer Immunreaktion die Expression dieser gedrosselt wird (siehe Einleitung). Dieses Erkenntnis vorausgesetzt, dienten zwei Leberproben von HCV infizierten Mäusen desselben Modells als Kontrolle des Messverfahrens. Die Abbildung 7 bestätigt, dass in zwei zur Verfügung stehenden Lebern mit HCV Infektion entsprechend dem aktuellen Stand der Forschung weniger miR-122 exprimiert wurde, verglichen mit nicht-infiziertem bzw. HBV infiziertem Gewebe. Es wurde also davon ausgegangen, dass generell ausgeprägte Effekte auch trotz der hybriden Gewebeeigenschaften und der Spezies übergreifenden Konservierung mit dem rtPCR Verfahren gemessen werden könnten. Unklar war allerdings, inwieweit sich eine Infektion der humanen Hepatozyten mit dem Hepatitis-B bzw. Hepatitis-C-Virus parakrin auf benachbarte, murine Zellen auswirkt. Da microRNA als solche hochkonserviert sind, wäre auch ein parakriner oder endokriner Effekt über Speziesgrenzen hinweg denkbar. In diesem Falle könnten auch die Hepatozyten murinen Ursprungs mit einem alterierten microRNA Expressionsmuster reagieren. Unter der Prämisse, dass sich somit microRNA extrazellulär distribuieren könnte, stellt sich der exklusive Ansatz zur Quantifizierung nur mittels rtPCR und Normalisierung gegenüber einem „house-

keeping-Gen als unzulänglich dar, weil hierbei mit einer zellulären Expression relativiert wird.

3.2 Vorkommen von MicroRNA im murinen Serum-rtPCR mit Spike Verfahren

3.2.1 Einführung des Spike-Verfahrens für Serumanalysen

Die Versuchsreihe wurde daher nochmals ausgeweitet mit der Zielsetzung, microRNA auch im Serum der Versuchstiere nachzuweisen und quantifizieren können. Es ließen sich damit mögliche Erkenntnisse über die vermuteten parakrinen Effekte gewinnen. Hierfür war das zuvor eingesetzte Quantifizierungsverfahren der relativen Expression mittels miR-26b unbrauchbar, da diese nur für gewebegestützte Messungen sinnvoll ist. Es wurde daher eine feste, exogene Kontrolle in Form eines artifiziellen Spikes in der aus dem Serum extrahierten RNA benötigt. Es eignete sich hierfür hervorragend die weder in menschlichen noch in murinen Zellen vorkommende cel-miR-39, eine Mikro RNA des Modellorganismus *c. elegans*. Im Etablierungsversuch wurde jede Serumprobe mit der definierten Menge von 7,4 pMol cel-miR-39 inokuliert. Es imponierte in der darauffolgenden Messung mittels rtPCR eine relativ gleichmäßige Menge des Spikes in nahezu allen bearbeiteten Proben. Fehlerhaft aufbereitete (bzw. amplifizierte) Proben ließen sich sofort anhand der Abweichung des Spike-CT vom Medianwert identifizieren und konnten vom Versuch ausgeschlossen werden. Somit diente das neue Verfahren gleichzeitig als Qualitätsmarker für den Aufreinigungs-/ Ampflifizierungsprozess.

Bei 26 Proben aus murinem Serum wurde eine Menge von je 7,4 pMol der cel-miR-39 in den Aufarbeitungsprozess integriert. Im Rahmen der rtPCR Messung ergab sich für cel-miR-39 über alle Proben hinweg ein Medianer Cycle Threshold von 13,491.

Vier Proben wiesen auffällige Abweichungen von Median auf (CT 22,8; 21,7; 22,9; 17,8) und wurden vom Versuch ausgeschlossen (Abb. 8).

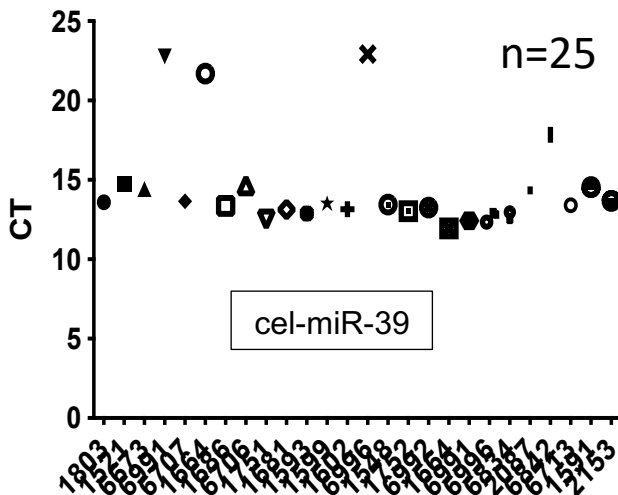


Abbildung 8 – Real-Time-PCR der (Spike-)cel-miR-39, die einer Gruppe von 25 murinen Serum-Proben künstlich hinzugefügt wurde

Cycle-Threshold-Wert (CT, y-Achse) der cel-miR-39 bei Messung mittels rtPCR nach vorheriger Amplifikation (wie eingangs beschrieben). Untersucht wurden die Seren von 25 Versuchstieren (x-Achse, vierstellige Versuchsternummern), nachdem im Rahmen des Spike-Verfahrens jeweils 7,4pMol der cel-miR-39 pro Serum künstlich hinzugefügt wurden. Vier Proben weichen stark vom medianen Cycle-Threshold (13,491) ab, was auf eine fehlerhafte Amplifikation hindeutet.

3.2.2 Freie miR-122 im Serum infizierter Tiere vs. humanes Kontrollserum

Zunächst wurden Seren derselben Versuchstiere untersucht, deren Lebern bereits hinsichtlich miR-122 Expression untersucht worden waren. Es hatte sich dabei (intrahepatisch) kein signifikanter Unterschied zwischen den mit HBV infizierten und den nicht-infizierten Tieren gezeigt. Die Messung der freien miR-122 im Serum der Tiere ergab ein anderes, wenn auch statistisch nicht signifikantes Bild. Es fielen bei beiden HBV-positiven Seren im Vergleich mit den anderen Gruppen die deutlich erhöhten Mengen miR-122 auf. Im humanen Kontrollserum war miR-122 nicht nachweisbar.

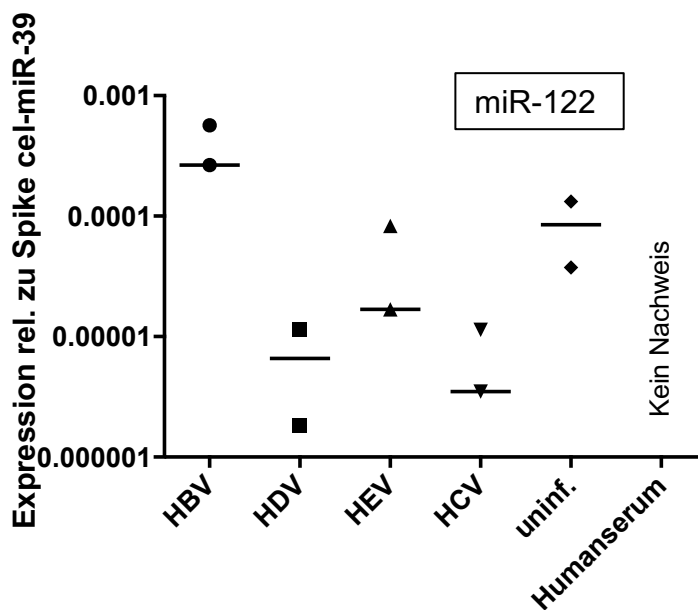


Abbildung 9 – Real-Time-PCR der miR-122 in murinem / humanem Serum (n=12)

Menge der in den Serumproben nachweisbaren miR-122 relativ zur bekannten Spike-Kontrolle (cel-miR-39). Insgesamt wurde aus 12 Serumproben microRNA extrahiert, diese daraufhin amplifiziert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend quantitative rtPCR der miR-122. Es zeigt sich in den Seren der HBV-infizierten Mäuse eine vergleichsweise große Menge freier miR-122. Eine statistische Signifikanz erfordert eine größere Anzahl der Proben.

3.3 Etablierung des Hybridisierungsprotokolls für MicroRNA in Leberkryotomschnitten

3.3.1 MicroRNA in-situ Hybridisierung

Da mittels rtPCR aufgrund der hybriden Beschaffenheit der murinen Versuchslebern keine gezielte Aussage über Expressionsmuster in humanen Hepatozyten getroffen werden konnte, wurde die Implementierung einer neuen Untersuchungsmethode angestrebt. Verfolgt wurde der Ansatz einer RNA-*in-situ*-Hybridisierung (RNA-ISH) der microRNA. Im Rahmen umfangreicher Etablierungsversuche wurde das o.g. Arbeitsprotokoll zur FISH von microRNA in kryo-konserviertem Lebergewebe erstellt. Abbildung 10 zeigt Aufnahmen eines frühen Versuchs der RNA-ISH. Die Hybridisierung einer human-spezifischen mRNA (humanes Aktin-beta, hACTB) schlug hierbei fehl, sodass zwischen human-repopulierten und murinen Arealen initial nicht unterschieden werden konnte. Rot stellen sich hybridisierte miR-122 Moleküle dar. Die Färbung basierte in diesem Versuchsstadium auf einem enzymatischen Umsatz mittels alkalischer Phosphatase und wirkte daher eher flächig und verwaschen, eine gezielte Auswertung einzelner, punktförmiger Signale war nicht möglich (vgl. Abb. 10C). Übersichtsaufnahmen dieser flächigen Färbungen ließen jedoch vermuten, dass es hinsichtlich des Expressionsniveaus innerhalb eines Schnittes mehrere, deutlich differenzierbare, Cluster artige Bereiche gab (vgl. Abb. 8A). Ein eindeutiges, morphologisches Korrelat ließ sich dabei aufgrund des fehlenden, humanen Markers zunächst nicht differenzieren.

Unter näherer Betrachtung des Gewebes offenbarte sich die initial unzureichende Qualität der Hybridisierung von miR-122 im Verfahren mit alkalischer Phosphatase. Aussagekräftige Differenzierungen der Signale zwischen einzelnen Zellen waren zunächst nicht möglich, da sich eher eine flächige Färbung als punktförmige Signale ergab. Die Qualität nahm offensichtlich ab, je mehr Zielmoleküle in einer Zelle vorhanden waren. Während die Signale in Bereichen mit geringer Dichte noch mäßig differenzierbar waren, nahm die Qualität bei mehreren, überlagerten Signalen deutlich ab und führte zur o.g. flächigen Anreicherung von rotem Farbstoff (Abb. 10B+C).

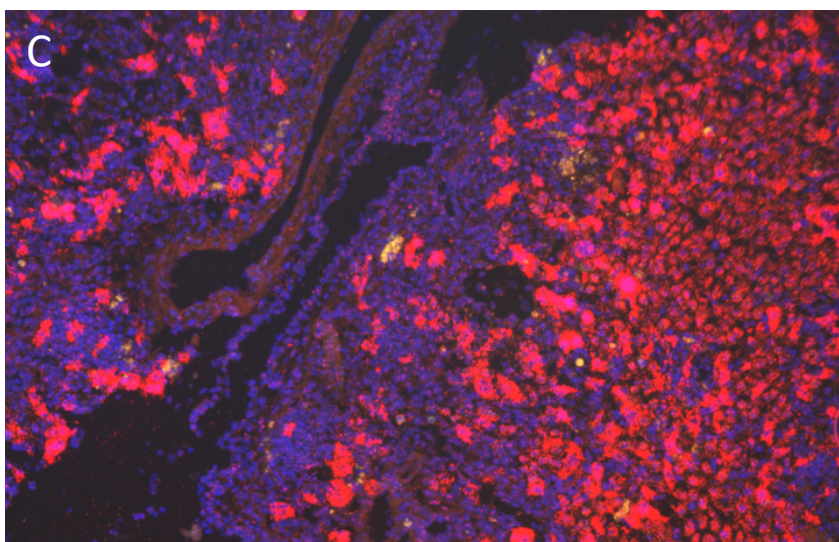
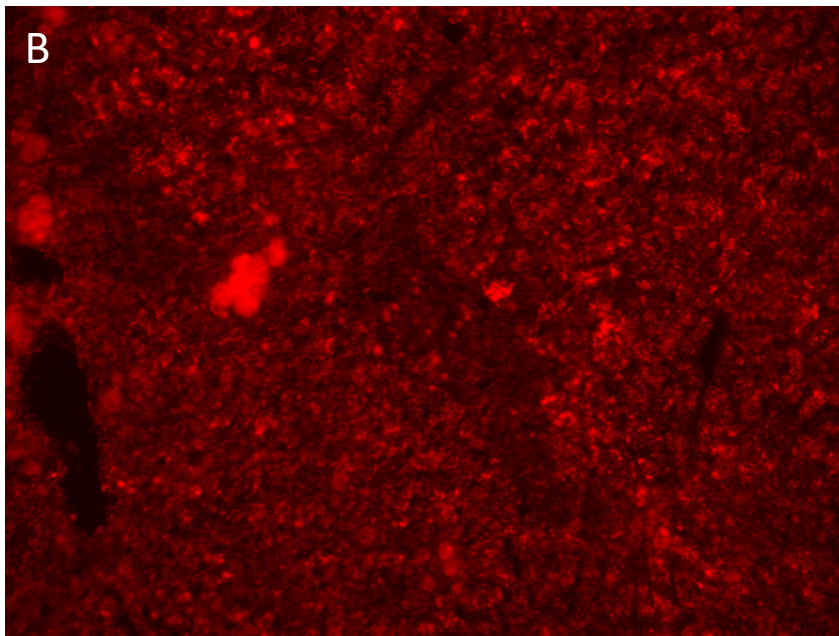
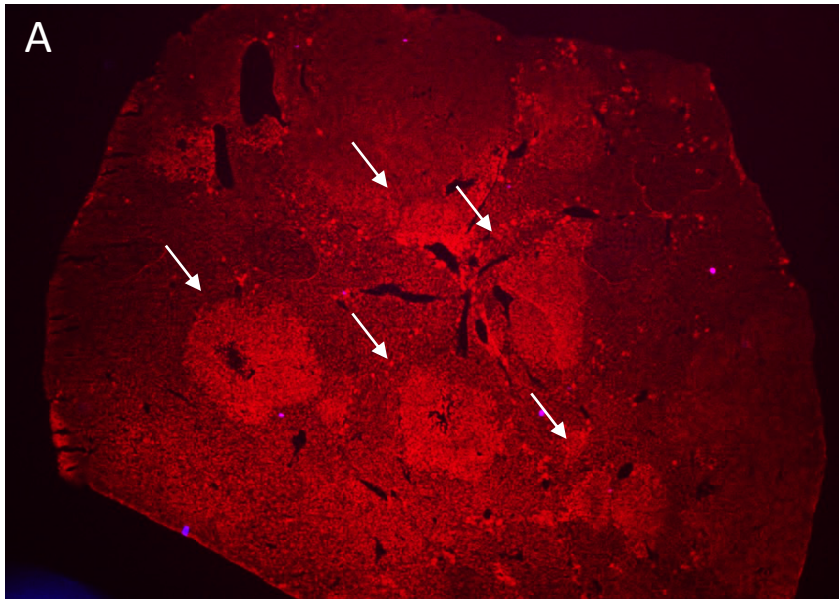


Abbildung 10 –
Hybridisierung von miR-122 in chimären UPA/SCID Mäuselebern mittels AP-Farbumsatz (alkalische Phosphatase) – frühes Versuchsstadium

Übersichtsaufnahmen des Lebergewebes einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten.

Rot: Hybridisierung der miR-122 Moleküle mittels enzymatischem Farbumsatz in einem frühen Versuchsstadium (alkalische Phosphatase). Mit den weißen Pfeilen sind auffällige Cluster verstärkter Expression der miR-122 markiert, wobei das morphologische Korrelat hier unklar bleibt (A). Je stärker der enzymatische Farbumsatz, desto weniger differenzierbar sind Farbsignale unterschiedlicher Zellen (B+C). Repräsentative Bilder.

Blau: Zellkernfärbung mit DAPI

A: Vergrößerung 5x
 B: Vergrößerung 20x
 C: Vergrößerung 20x

Die simultane Erprobung der humanspezifischen Sonde ergab zunächst zufriedenstellende Ergebnisse. Die initial getestete Sonde für hACTB-mRNA hybridisierte mit dem Fluoreszenzfarbstoff und zeigte ein präzises Hybridisierungsmuster mit deutlichen Signalen. Auch in 60-facher Vergrößerung stellten sich die hACTB-Signale (grün) kaum verwaschen und singulär dar (vgl. Abb 11A). In dieser Abbildung ist auch nochmals der Qualitätsunterschied zwischen den Punktsignalen des AP-basierten Farbstoffes im roten Kanal und dem Fluoreszenzfarbstoff im grünen Kanal deutlich zu erkennen. Die angewandte Sonde für hACTB ermöglichte jedoch keine ausreichende, humane Spezifität, da sie auch in nicht-humanen negativ-Kontrollen unspezifisch hybridisierte: Bei der Untersuchung der chimären, murin/humanen Leberproben hybridisierten auch in Gallengangsepithelen und Gefäßendothelien geringe Mengen humaner Signale, obwohl diese innerhalb der Versuchslebern ausschließlich murinen Ursprungs sind. Auch im Schnittbild einer ausschließlich murinen Milz ergaben sich offensichtlich falsch positive Signale für hACTB (Abb. 11B).

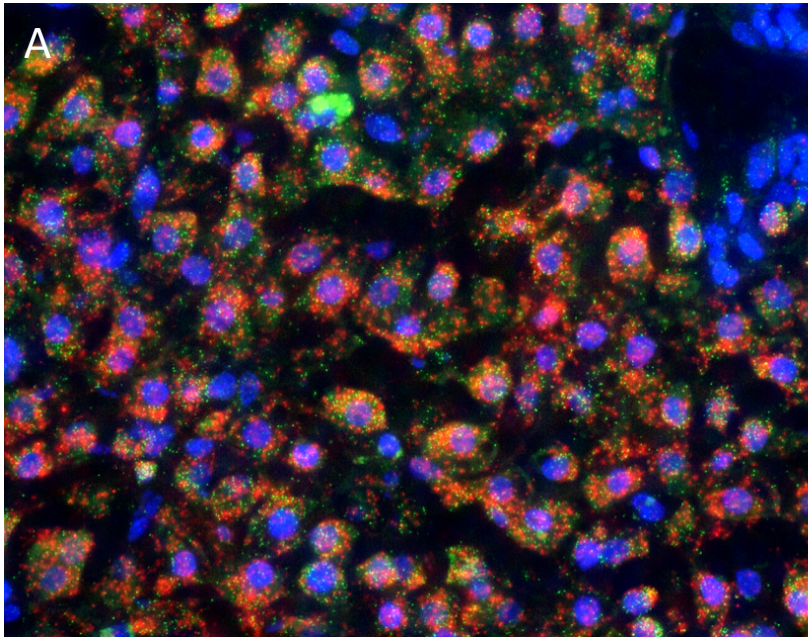


Abbildung 11 –
Lebergewebe und Milzgewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten. ISH mittels AP-Farbumsatz (alkalische Phosphatase) und Alexa-488 Sonde – frühes Stadium

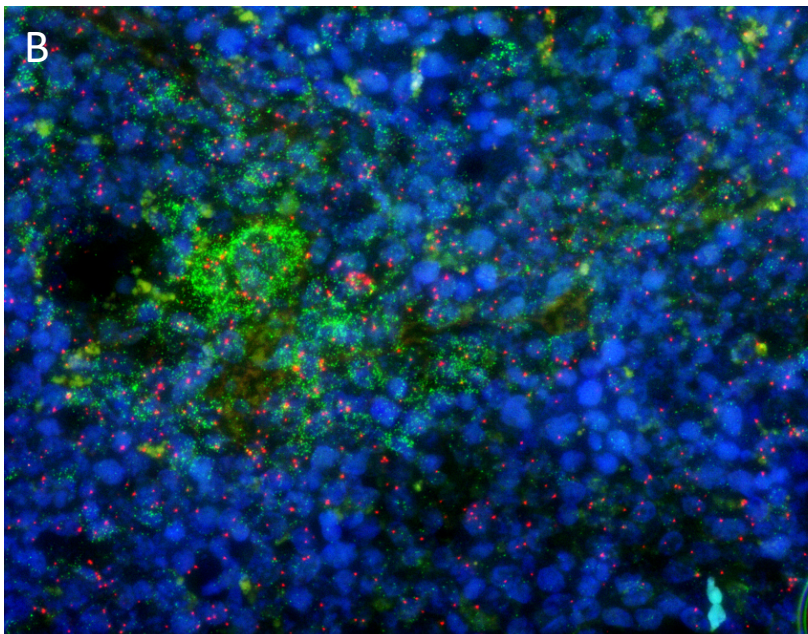
A Rot: Hybridisierung der miR-122 Moleküle mittels enzymatischem Farbumsatz in einem frühen Versuchsstadium

(alkalische Phosphatase).

Grün: Fluoreszenzsignal humanes Actin-beta (hACTB). **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Auffällig die unterschiedliche

Signalqualität innerhalb eines Bildes. Oben rechts ein morphologisch nicht Hepatozyten-typisches Areal murinen Ursprunges. Repräsentatives Bild.

Vergrößerung 60x



Vergrößerung 60x

B Milzgewebe einer chimären UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten. **Rot:** Hybridisierung der miR-122 Moleküle mittels enzymatischem Farbumsatz in einem fortgeschrittenen Versuchsstadium (alkalische Phosphatase).

Grün: Fluoreszenzsignal humanes Actin-beta (hACTB). **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Eine dauerhafte Besiedlung mit humanen Zellen liegt in der murinen Milz nicht vor, die Injektion erfolgt jedoch intraperitoneal. Vergrößerung 60x

Interessanterweise ergab die Hybridisierung der miR-122 im Falle der Milz eine deutlich bessere Qualität mit klar abgrenzbaren, singulären Signalen ohne flächige Anfärbung. Grund dafür war – passend zu den Beobachtungen in hepatischen Schnitten – am ehesten das deutlich niedrigere Expressionsniveau mit <5 Signalen pro Zelle. (Abb. 11B).

3.3.2 Variation des Hybridisierungsprotokolls. Implementierung des viewRNA plus Moduls

Da im Laufe dieser experimentellen Arbeit eine Erweiterung /Variation der ViewRNA-Technologie verfügbar war (ViewRNA plus) wurde das Verfahren zur verbesserten Befunderhebung nochmals verändert: Für die Hybridisierung der microRNA-Moleküle stand nunmehr ebenfalls eine direkt fluoreszierende Sonde zur Verfügung, statt der vormals verwendeten enzymbasierten und *fast-red*-Substrat abhängigen Färbung. Zudem wurde zur humanen Kontrolle eine Sonde für humanes Beta-2-Mikroglobulin (hB2M) etabliert. Es ergaben sich nunmehr qualitativ deutlich hochwertigere Bilder. Im Gegensatz zu frühen Versuchsstadien konnten die Fluoreszenzsignale sowohl im Kanal der microRNA (Alexa 546 rot), als auch im sekundären Kanal der humanen Kontrolle (Alexa 488 grün) deutlich abgegrenzt werden und stellten sich nicht flächig, sondern scharf, punktförmig und mit deutlich reduzierter Überlagerung dar. Es zeigten sich darüber hinaus keine humanen Signale in den murinen, nicht-parenchymalen Zellen (NPC). Beobachtet wurde eine auffällig inhomogene Verteilung der microRNA-122 Moleküle. Insbesondere murine Hepatozyten schienen deutlich mehr miR-122 zu exprimieren. Eine Erkenntnis die vor allem Hinblickend auf die Interpretation der initialen, spezieübergreifenden PCR-Quantifizierung von Relevanz ist. Abbildung 12A zeigt einen Bildausschnitt, in welchem der Übergang zwischen humaner und muriner Zellpopulation gut zu sehen ist und auch die Diskrepanz zwischen der miR-122 Expression verdeutlicht. Darüber hinaus bestätigte sich die in zahllosen Studien postulierte Hypothese, dass miR-122 vornehmlich in Hepatozyten exprimiert wird: Gefäßassoziierte Zellen der Glisson Trias im Bereich der periportalen Felder zeigten fast keine Signale für miR-122 (Abb. 12B).

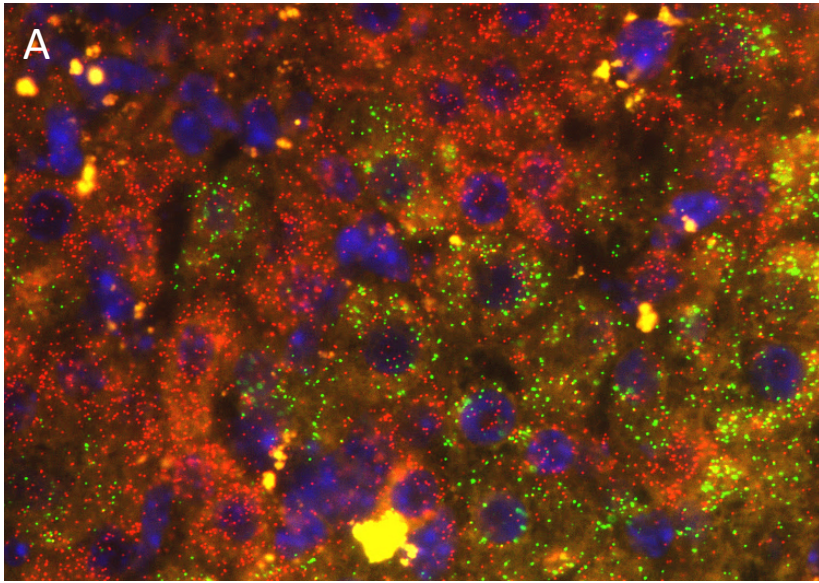
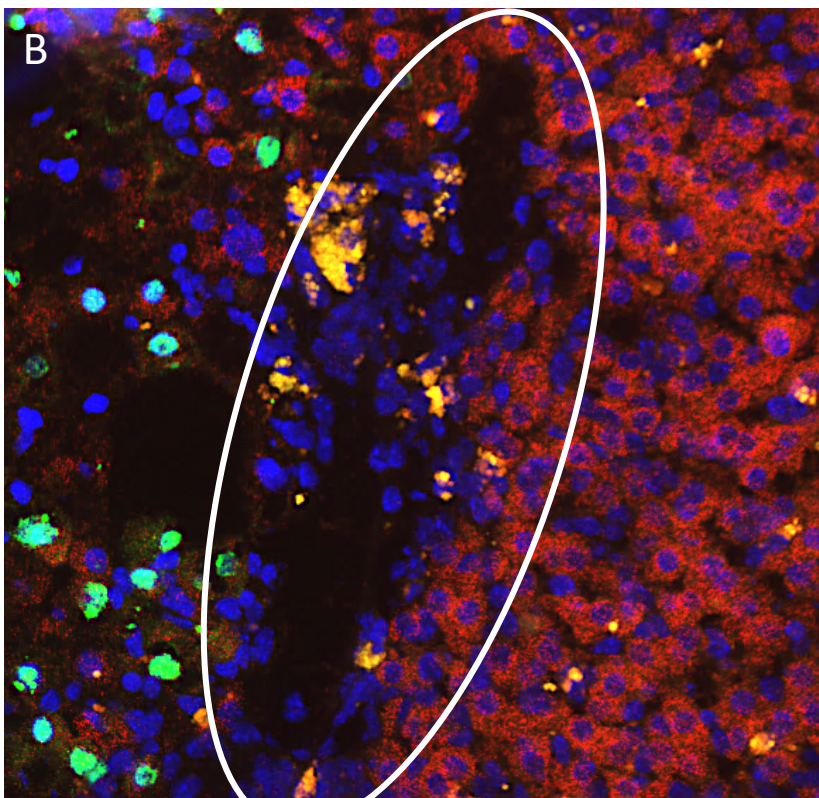


Abbildung 12 - **Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten. ISH im Verbesserten Protokoll mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)**

A Kryoschnitt aus Lebergewebe einer chimären UPA/SCID Maus. **Rot:** miR-122. **Grün:** hB2M. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Es zeigen sich mit diesem Verfahren deutliche Unterschiede zwischen den Zellen hinsichtlich der Expression von miR-122. Die Zellen mit humaner Genexpression (hB2M) weisen in diesem Beispiel eine sichtbar geringere Expression der miR-122 auf. Die orangen Anteile repräsentieren a.e. Makrophagen mit weitem Reflexionsspektrum. Vergrößerung 60x.



B Kryoschnitt aus Lebergewebe einer chimären UPA/SCID Maus. **Rot:** miR-122. **Grün:** Hepatitis-D-RNA. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. In der rechten Bildhälfte wird keinerlei virale RNA-hybridisiert, daher handelt es sich hier a.e. um ein murines Areal der Leber. In der linken Bildhälfte sind mehrere grüne, d.h. HDV infizierte Zellkerne zu sehen. Zwischen murinem und humanem Anteil besteht ein deutlicher Unterschied hinsichtlich der Expression von miR-122 (rot) Eingekreist ein Gefäßstrang mit Endothelien und Makrophagen, in diesen Zellen ist keinerlei Expression von miR-122 ersichtlich. Vergrößerung 60x.

3.4 Nachweis durch Hybridisierung von hepatischer microRNA-122 im Rahmen verschiedener viraler Hepatitiden

3.4.1 Bestimmung der intrazellulären miR-122 Menge in Abhängigkeit der Viruslast

Nach erfolgreicher Etablierung des ISH-Protokolls wurde nun eine Identifizierung infizierter Hepatozyten im Gewebeschnitt angestrebt. Hinsichtlich miR-122 Expression in HBV-Infizierten Mäusen hatte sich mittels PCR im Lebergewebe kein signifikanter Unterschied gegenüber nicht-infizierten Tieren gezeigt. Vor dem Hintergrund der offensichtlich sehr inhomogenen Verteilung der miR-122 und der mutmaßlichen höheren Expression in murinen Zellen waren die Ergebnisse der PCR kritisch zu betrachten.

Wir belegten den sekundären optischen Kanal, in welchem vormals hB2M zur Darstellung kam, nunmehr mit Virus-spezifischen RNA Sonden. Somit war es uns möglich, die Verteilung von viraler RNA unterschiedlicher Hepatitiden im Gewebeschnitt zu visualisieren und gleichzeitig mit der miR-122 Dichte in den umgebenen Zellen darzustellen.

Es gelang die Hybridisierung von Virus-RNA in allen untersuchten Infektionstypen. Auch die gleichzeitige Darstellung von miR-122 gelang:

HCV

Die Anzahl HCV infizierter (humaner) Hepatozyten im Lebergewebe war hier eher gering (< 5 positive Zellen je Bildausschnitt), verglichen mit der Rate positiver Zellen in den Gewebedarstellungen HBV/HDV/HEV-infizierter uPA/SCID Mäuse.

Zwischen humanen und murinen Zellen kann somit in dieser Ansicht nicht sicher differenziert werden. Insgesamt scheint die Anzahl der zytosolischen miR-122 im Umfeld der HCV-positiven Hepatozyten eher etwas geringer als in den Proben der anderen viralen Hepatitiden bzw. nicht infizierter Tiere. Zuverlässige Aussagen benötigen hier jedoch deutlich größere Kollektive mit standardisierten Bedingungen.

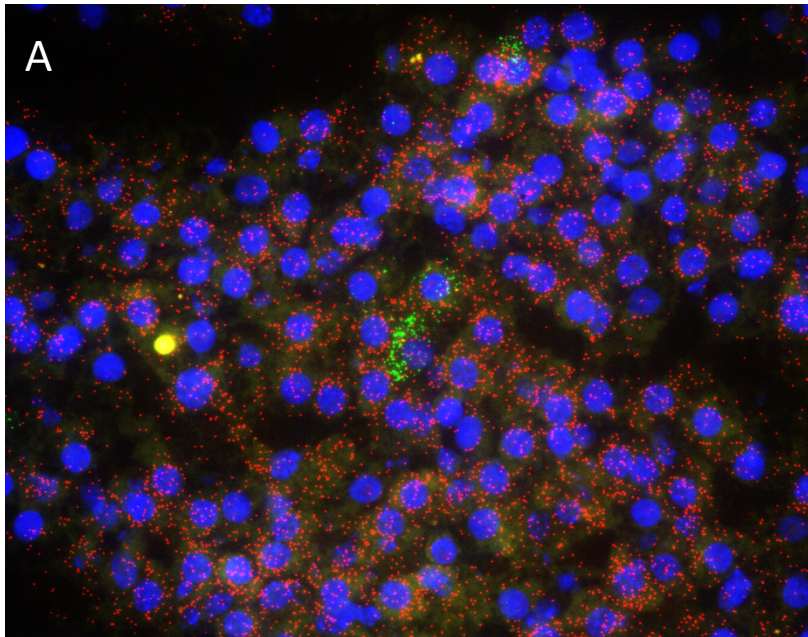
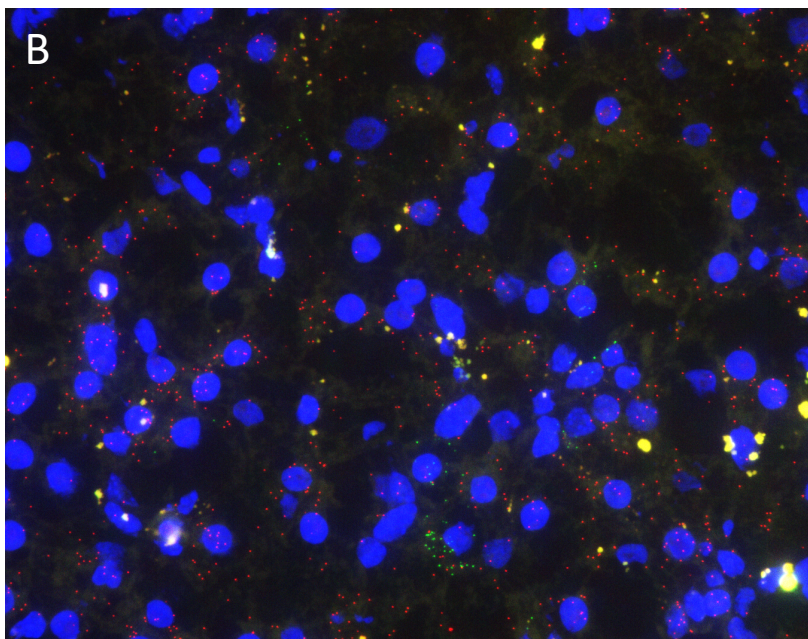


Abbildung 13 - Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-C Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)

A Kryoschnitt aus Lebergewebe einer chimären UPA/SCID Maus. **Rot:** miR-122. **Grün:** Hepatitis-C-RNA. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI.

Im Bild ein Cluster Hepatozyten, von denen 3-4 Zellen eine Infektion mit HCV aufweisen (grüne Signale). Insgesamt weist der Cluster eine eher geringe miR-122 Aktivität auf, die jedoch in den HCV-positiven Zellen nicht von den umgebenden Zellen differiert.



B Kryoschnitt aus Lebergewebe einer chimären UPA/SCID Maus. **Rot:** miR-122. **Grün:** Hepatitis-C-RNA. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI.

Im Bild ebenfalls ein Cluster humaner Hepatozyten, von denen hier 2-3 Zellen eine Infektion mit HCV aufweisen (grüne Signale). Es zeigt sich im Vergleich zu Abb. 13A eine noch geringere Aktivität von miR-122.

Vergrößerung 60x

HDV

Virale HDV-RNA war bei dieser Hybridisierung als grünes Signal (Alexa 488) deutlich erkennbar. Vor allem die typische, intranukleäre Präsenz von viraler RNA stach heraus. Eindrücklich ist in Abbildung 14D die Grenze zwischen humanen Hepatozyten in der linken Bildhälfte und mutmaßlich murinen Hepatozyten in der rechten Bildhälfte. Bemerkenswert ist in diesem Bild zudem die Präsenz einer Vielzahl von Lipidvakuolen im humanen Areal des Gewebes. Im Rahmen des Fixierungsprozesses wurde deren fettlöslicher Inhalt aus dem Gewebe gelöst. Hier sichtbare, murine Zellen exprimieren, wie bereits erwähnt, deutlich größere Mengen miR-122 – die dazwischen liegenden nicht-parenchymalen Zellen der Gefäßbahn zeigen keine Expression. Aufgrund der hohen Anzahl der HDV-positiven Zellen im Sichtfeld, lässt sich morphologisch eine grobe Einteilung in humane und murine Cluster vornehmen. In Abbildung 14A-C zeigt sich, dass hoch-positive HDV infizierte Zellen eher geringere Mengen der miR-122 im Zytoplasma aufweisen, verglichen mit den umliegenden Zellen.

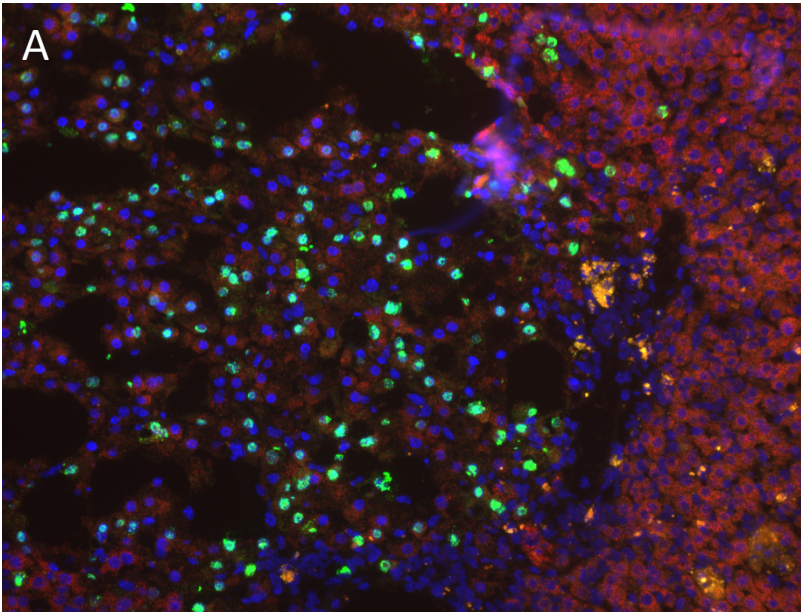
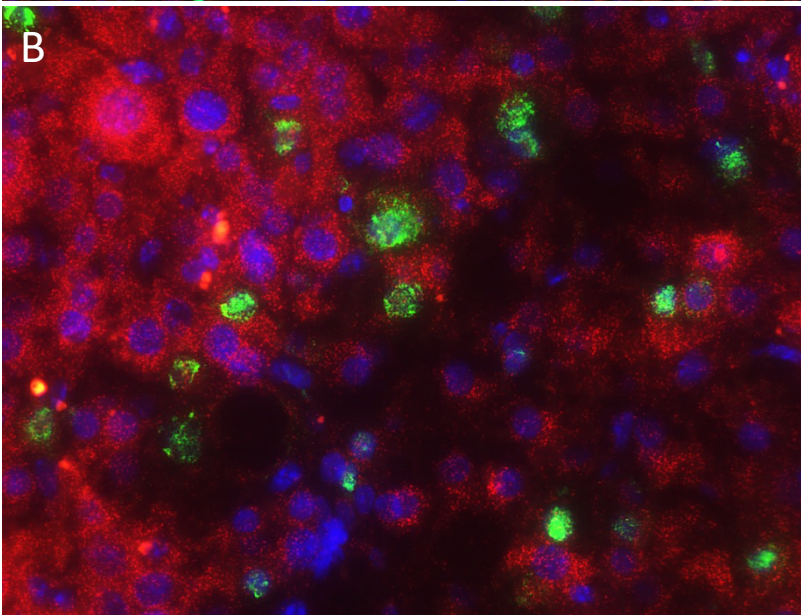
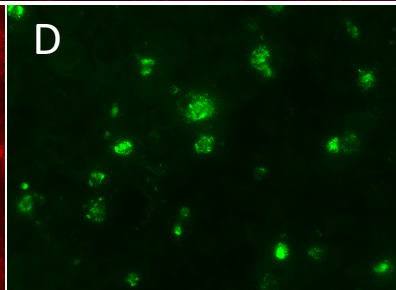
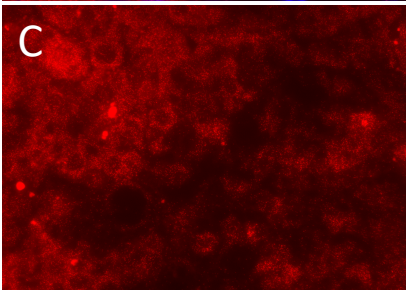


Abbildung 14 - Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-D Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)

A Lebergewebe einer UPA/SCID- Maus. **Rot:** MiR-122. **Grün:** Hepatitis-D-RNA (*patient*). **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Deutlich zu erkennen sind in der linken Bildhälfte eine Vielzahl von HDV-positiven Zellen mit dem typischen, intranukleären Signal (grün). Auch hier zeigen die mit Virus-RNA belasteten Zellen eine geringere Expression von miR-122 (rote Signale). Außerdem mehrere Lipid-Vakuolen (schwarze Aussparungen). In der rechten Bildhälfte sind weniger HDV-positive Zellen lokalisiert, die Gewebearchitektur wirkt durch fehlende Lipidvakuolen und Ausrichtung der Hepatozyten zur Lebervene hin deutlich physiologischer. Es ist dort auch eine stärkere Expression von miR-122 zu erkennen.



B Lebergewebe einer UPA/SCID- Maus. **Rot:** MiR-122. **Grün:** Hepatitis-D-RNA (*patient*). **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Es zeigen sich im Bildausschnitt ca. 20 HDV-infizierte Zellen mit den typischen, überwiegend intranukleären RNA-Signalen (grün). Im Vergleich zu den umliegenden (nicht infizierten Zellen) sind in den HDV-positiven Zellen weniger miR-122 Signale zu erkennen (rot)



C Roter Kanal isoliert
D Grüner Kanal isoliert
Vergrößerung 60x

HBV

In Abbildung 15A ist die RNA-*in-situ*-Hybridisierung eines Gewebeschnittes (chimäre uPA/SCID-Maus) mit HBV-Infektion dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die große Viruslast (grün) im gezeigten Ausschnitt, mit der überwiegenden Anzahl der Zellen, welche virale RNA exprimieren. Diese infizierten Zellen scheinen geringere Mengen der rot hybridisierten miR-122 zu exprimieren. Virus-RNA freie Zellen hingegen imponieren mit einem starken mikro-RNA Signal. Unklar ist hierbei, ob es sich bei den stark miR-122 exprimierenden Zellen um murine oder humane Anteile der Hepatozytenpopulation handelt. Abbildung 15B zeigt eine Hybridisierung eines anderen Versuchstieres mit HBV-Infektion. Dort ist ebenfalls eine hohe Viruslast mit großem Anteil infizierter Zellen ersichtlich. Die Menge der miR-122 Signale ist im Vergleich größer und relativ gleichmäßig über alle Zellen verteilt. Abb. 15B zeigt auch eine signifikante Anzahl von Makrophagen im Bildausschnitt (orange Signale). Beide Aufnahmen der HBV-infizierten Tiere zeigen eine pathologische Gewebearchitektur mit vielen Lipideinlagerungen und unorganisiertem Verbund der Hepatozyten. Für sichere Aussagen zur miR-122 Expression sind auch hier große Kollektive mit standardisierten Bedingungen notwendig.

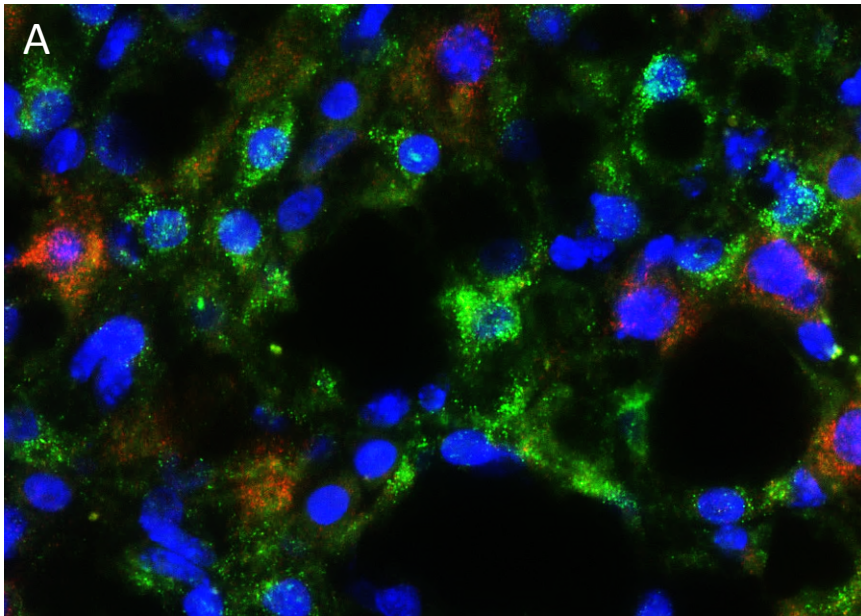
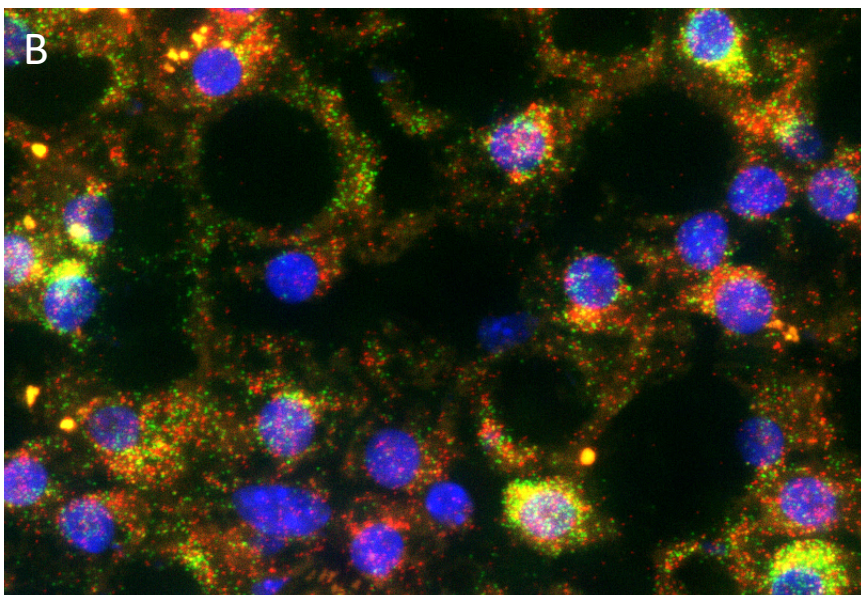


Abbildung 15 -
Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-B Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)

A Lebergewebe eine UPA/SCID- Maus. **Rot:** MiR-122. **Grün:** Hepatitis B RNA. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Schwarze Bereiche entsprechen Lipidvakuolen, welche im Rahmen des Fixierungsprotokolls aus dem Gewebe gelöst wurden. Es zeigt sich eine insgesamt pathologisch anmutende Gewebearchitektur mit ausgeprägter Lipideinlagerung. Die grünen Signale verdeutlichen die Anwesenheit viraler RNA in fast allen, abgebildeten Zellen. MiR-122 (rote Signale) wird nur in ca. 20 Zellen des Bildausschnittes exprimiert. Die Bereiche mit starker miR-122 Aktivität weisen geringere Mengen viraler RNA auf. Vergrößerung 60x.



B Lebergewebe eine UPA/SCID- Maus. **Rot:** MiR-122. **Grün:** Hepatitis B RNA. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Schwarze Bereiche entsprechen Lipidvakuolen, welche im Rahmen des Fixierungsprotokolls aus dem Gewebe gelöst wurden. Es zeigt sich auch in diesem Beispiel eine pathologisch anmutende Gewebearchitektur mit ausgeprägter Lipideinlagerung und hoher Aktivität von Makrophagen, vor allem in der oberen Bildhälfte.

Virale RNA wird hier in allen abgebildeten Zellen nachgewiesen, ebenso miR-122. Vergrößerung 60x.

HEV

Auch im Falle der HEV-infizierten Mäuse gelang mit dem neuen Verfahren eine gleichzeitige in-situ-Hybridisierung von viraler RNA und miR-122. Es stellt sich im linken, oberen Bildteil der Abbildung 16 eine größere Anzahl Hepatitis-E infizierter, humaner Zellen dar, welche verglichen mit den benachbarten Zellen im Bild eher wenig miR-122 exprimieren. Die Gesamtmenge der miR-122 ist im Bildausschnitt eher gering. Unten rechts deutlich ein Bereich ohne miR-122 Expression, die genaue Art und Beschaffenheit dieser Zellansammlung bleibt unklar. Zwischen den infizierten Zellen finden sich auch hier Lipidvakuolen und eine aufgelockerte, pathologische Gewebearchitektur.

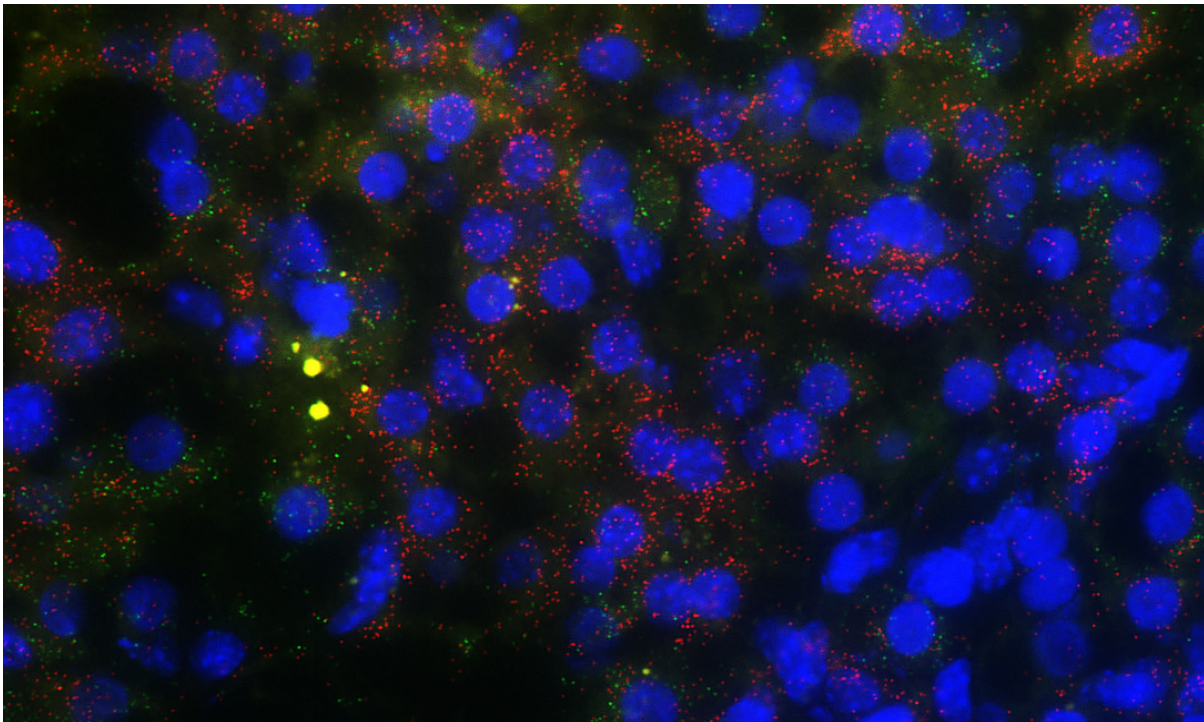


Abbildung 16 - Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-E Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)

Lebergewebe eine UPA/SCID- Maus. **Rot:** MiR-122. **Grün:** Hepatitis E RNA. **Blau:** Kernfärbung mit DAPI. Vor allem in der oberen-linken Bildhälfte vermehrte Präsenz von viraler (Hepatitis-E) RNA mit auffälliger Expression von miR-122 in direkter Umgebung der infizierten Zellen. Die nicht infizierten Zellen weisen in dieser Abbildung eine geringere Expression von miR-122 auf. Vergrößerung 60x.

In Zusammenschau ist eine simultane Hybridisierung von viraler RNA und miR-122 in allen zur Verfügung stehenden Infektionstypen der chimären uPA/SCID-Mäuse gelungen. Es konnten erfolgreich neue Protokolle etabliert und viele Fallstricke der neuen Untersuchungstechnik aufgezeigt werden. Die Bilder gelangen qualitativ hochwertig.

4 Diskussion

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss verschiedener viraler Hepatitiden auf die Produktion von microRNA in Hepatozyten zu charakterisieren.

Es ergaben sich daher folgende Arbeitsschritte:

1. Die Etablierung neuer Methoden (Amplifizierung, rtPCR, FISH) zur Quantifizierung und Visualisierung von microRNA in chimären uPA/SCID-Mäusen mit viraler Hepatitis.
2. Validierung der Messverfahren in Bezug auf die Expression von miR-122 unter Hepatitis C Infektion (hier besteht eine sichere Datenlage über die Wechselwirkung zwischen miR-122 und HCV, jedoch nicht im Bereich der Maus/Mensch-chimären Lebern).
3. Abschließend die Untersuchung der Expression von miR-122 in den Lebern/Seren der Versuchstiere insbesondere mit Hinblick auf die chimären Lebern.

Die Quantifizierung spezifischer Mikro-RNA in chimären Mausmodellen ist herausfordernd, weil relevante microRNA Spezies-übergreifend konserviert sind; ein vielversprechender Ansatz zur präzisen Differenzierung ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der zu untersuchenden microRNA.

PCR-basierte Analysen der Leber können nicht zwischen den microRNA verschiedener Spezies unterscheiden und sind somit zur Differenzierung kaum geeignet. Innerhalb der Leberproben zeigte sich dabei nicht etwa miR-122 dominant (wie in Hepatozyten zu erwarten), was auf einen hohen Anteil von nicht-Hepatozyten in der Zellmischung hinweist.

In Serumproben konnten unter Zuhilfenahme der neu etablierten Amplifikationstechnik auch kleinste Mengen frei zirkulierender microRNA gut nachgewiesen werden. Auffällig war hierbei der Hinweis auf größere Mengen freier miR-122 im Serum von HBV infizierten Mäusen im Vergleich zu den nicht-HB-infizierten Tieren – hier wäre ein Versuch an einer größeren Gruppe von Versuchstieren vielversprechend.

Im Rahmen der bildgebenden Technik microRNA-ISH zeigte sich im Verlauf, dass in unserem chimären Infektionsmodell die Hepatozyten-dominante miR-122 in den murinen Zellen deutlich stärker exprimiert wird als in den humanen Zellbereichen. Es schließt sich daraus, dass die interessanten Expressionsschwankungen in den infizierten, humanen Zellen bei unseren PCR Messungen maskiert sein könnten. Grundsätzlich ist das ISH-microRNA Verfahren daher besser geeignet, um die Expression bestimmter microRNA in chimären Lebern zu zeigen.

Die Technik war entgegen den Herstellervorgaben auch in Gefrierschnitten gut anwendbar, hierfür war jedoch eine deutliche Anpassung des Protokolls notwendig (siehe Material und Methoden).

Diese Arbeit bietet eine Ausarbeitung der Möglichkeiten, des Potenzials und der Herausforderungen moderner microRNA Diagnostik in der experimentellen Forschung, insbes. im chimären UPA/SCID Mausmodell. Sie definiert jedoch keine neuartige Virus-Wirt-Interaktion im Rahmen einer HBV-Infektion.

Die Lesenden sollen beachten, dass in unserer Arbeitsgruppe bisher keine der genannten Methoden zur miR-Quantifizierung (microRNA-Extraktion mit Amplifikation, miR-rtPCR, miR-FISH) etabliert waren und im Rahmen dieser Arbeit aufwändig neu implementiert wurden. Das FISH-Verfahren war seitens des Herstellers nur für Paraffin eingebettete Gewebe getestet, die Anwendung an Kryotom-Schnitten wurde ebenfalls während dieser Arbeit umfangreich neu erarbeitet.

Wenngleich das uPA/SCID Modell im Rahmen der HBV Forschung das fortschrittlichste seiner Zeit ist, da es einen natürlichen Infektionsvorgang, Replikationszyklus und die ccc-DNA Formation am besten abbildet, erschwert es durch seine chimären Eigenschaften eine präzise Analyse auf microRNA Ebene.

Die Rolle der microRNA-122 im Rahmen der Hepatitis-B-Virus Infektion bleibt weiterhin unklar. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einige Antworten auf die Frage der Durchführbarkeit und Limitierung von Messungen von microRNA mit verschiedenen, modernen Verfahren. Offensichtlich ist, dass die Expression der microRNA multifaktoriell beeinflusst wird und ausschließlich anhand des Infektionsstaus (infiziert vs. nicht-infiziert) keine eindeutigen Zusammenhänge demaskiert werden können.

Obwohl mehrere Arbeiten (siehe Einleitung) miR-122 als dominanten Typ in Hepatozyten erkannt haben, stellte sich im Rahmen dieser Untersuchungen heraus, dass mindestens zwei andere microRNA (let-7, miR-26b) in ähnlich großem Umfang im Leberzellgemisch vorkamen.

Dies lässt Raum für mehrere Interpretationen als mögliche Erklärung: Zum einen dürfte das Expressionsprofil der Hepatozyten angesichts der metabolischen Situation in diesem speziellen Mausmodell stark verändert sein im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Andererseits ist sicher anzunehmen, dass die entnommenen Gewebeproben der Mauslebern nicht vollständig aus Hepatozyten zusammengesetzt waren. Somit besteht ein nicht zu vernachlässigender Anteil der mittels PCR analysierten Proben aus hepatischen (murinen) NPC (Gefäßendothelien, Gallengangsepithelien, Fibrozyten, Kupffer-Zellen, zirkulierende hämatologische Zellen uvm.). Passend zu dieser Annahme ist, dass sich im Rahmen der RNA-ISH-Bilder die mit abgebildeten NPC nahezu frei von miR-122 darstellten. Dies zeigt Limitationen aller PCR-basierten Messungen aus Zellgemischen auf. Zur genauen Erhebung von miR Schwankungen ausschließlich in Hepatozyten mittels PCR müsste also in folgenden Versuchen zunächst eine Separierung des entnommenen Zellgemisches nach Subtypen erfolgen (z.B. mittels magnetischer Zellsortierung MACS oder FACS).

Es bedarf zusätzlich an Grundlagenforschung im Rahmen von Quer- und Längsschnittstudien großer Populationen, um Erkenntnisse über ein physiologisches Spektrum der miR-Expression in (murinen und humanen) Hepatozyten zu gewinnen. Mögliche Einflussfaktoren wie Ernährungszustand, vegetative Erregung, zirkadiane Rhythmik, Mikrobiom, genetischer Einfluss müssten berücksichtigt werden, bevor eine valide Aussage über den Einfluss von Infektionen getroffen werden kann.

In diesem speziellen Versuchsaufbau mit chimären Mäusen kommt hinzu, dass es sich erstens um à priori pathologisch veränderte Lebern handelt (UPA transgen) welche mutmaßlich kein physiologisches Expressionsmuster von microRNA aufweisen. Weitere Versuchsreihen müssen also auch Hybridisierungen in Wildtyp-Mäusen beinhalten. Zweitens sind inter-Spezies Effekte in diesem Modell nicht sicher auszuschließen. So wären vor allem hinsichtlich der universell konservierten microRNA parakrine und auch endokrine Einflussnahmen von sowohl Wirts- als auch Spenderzellen aufeinander denkbar - durch eine Infektion möglicherweise noch

verstärkt im Sinne einer angeborenen, Spezies übergreifenden Immunantwort auf RNA-Ebene.

Auch die humanen Hepatozyten, welche zur Repopulierung herangezogen werden sind vor dem Hintergrund ihrer verschiedenen Spender zu betrachten. So stammen diese - je nach Zeitpunkt und Setting des initialen Versuchs - von primär explantierten Lebern mit kongenitalen oder erworbenen Pathologien. Andere Spenderhepatozyten wurden aus eigentlich gesunden Lebertransplantaten extrahiert, die bei einer Abstoßungsreaktion dem rezipierenden Patienten wieder entnommen werden mussten.

Um zunächst ein grundlegendes Verständnis über physiologische microRNA-Muster im menschlichen Lebergewebe zu gewinnen, muss eine Versuchsreihe mit Hybridisierung von humanen Leberbiopsien (diese sind eingeschränkt verfügbar) geplant und durchgeführt werden. Technisch sollte dies mit Hilfe des hier erarbeiteten Versuchsaufbaus gut durchführbar sein.

Für valide Aussagen hinsichtlich alterierter microRNA Expression im Rahmen unseres Mausmodells wäre entsprechend dann auch eine große Anzahl gesunder, humaner Leberzellen von Nöten, die als ausgewählte Spender zur Repopulierung der Mäuse dienen können.

Unter den repopulierten Lebern besteht eine nennenswerte Diversität hinsichtlich Ausmaßes und Erfolg der Repopulierung, Produktivität der viralen Infektion, sowie Viruslast intra- und extrazellulär. Hier hat sich jedoch vor allem in Bezug auf die Hepatitis B eine stabil hohe Erfolgsrate in unserer Arbeitsgruppe gezeigt.

Trotz der o.g. Limitierungen in diesem speziellen Versuchsaufbau hat sich die rtPCR aus Zellgemischen nach vorheriger Amplifizierung technisch gut bewährt. Auch kleinste Mengen microRNA konnten detektiert werden. Hervorzuheben ist hier (abseits der fraglichen klinischen Relevanz) die Messreihe zur miR-1231, welche im Gegensatz zu Kohno et. al. sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Lebern nachgewiesen werden konnte. Die Größenordnung bewegte sich hier (nach 1000facher Amplifikation!) im Bereich von 0,0001% der Housekeeping/ Referenz miR26b (Kohno et al., 2014).

In Anbetracht der eingeschränkten Aussagekraft o.g. PCR Verfahrens bei Spezies übergreifenden Zellgemischen hat sich die Differenzierung mittels Fluoreszenz-in-situ-

Hybridisierung hier jedoch ausgesprochen bewährt. Das Verfahren ist zwar zeit- und kostenaufwändig mit vielen, präzise zu befolgenden Einzelschritten, liefert jedoch bei optimaler Durchführung und Bedingungen gute Ergebnisse. Im besten Fall sind einzelne Leuchtsignale deutlich und singulär abgrenzbar, sodass diese durch Zählung präzise quantifiziert werden könnten. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein singuläres Signal im Bild nicht einem einzelnen RNA-Molekül entspricht, sondern immer eine größere Zahl Moleküle repräsentiert.

Zur Erhebung valider Daten (unter der Annahme, dass alle Störfaktoren vor dem Versuch eliminiert werden konnten) sind dabei genaue Kenntnisse der mikroskopischen Bildauswertung vorausgesetzt. Denn trotz der geringen Schichtdicke bei Gefrierschnitten (12 µm), liegen nicht alle Fluoreszenz-Signale in einer Bildebene und können somit nicht gleichzeitig fokussiert werden. Hier bedarf es multifokaler Aufnahmen (Z-Stack) und routinierter (optimal wären automatisierter) Auszählung der Signale. Im dreidimensionalen Raum kann außerdem nicht ausgeschlossen werden kann, dass Anteile einer räumlich tiefer (oder höher) gelegenen Zelle einer benachbarten Zelle zugeschlagen werden, welche möglicherweise einer anderen Population angehört. Daher wäre hierbei eine konfokal-mikroskopische Auswertung optimal.

Während der Literaturrecherche für diese Arbeit konnte keine andere Publikation identifiziert werden, welche die komplexe microRNA-Hybridisierung in uPA/SCID chimären Mäusen erprobte.

Im Rahmen dieser Arbeit ergab sich ein Problem mit der Auswertung der Hybridisierung, speziell im der chimären Leber: Zur korrekten Zuordnung und Evaluierung des miR-Status einer bestimmten Zelle bedarf es mindestens dreier, wenn nicht gar vier zugeordneter Informationen:

1. Ist die Zelle ein Hepatozyt?
2. Ist die Zelle murin oder human?
3. Ist die Zelle (mit viraler RNA) infiziert?
4. Und schließlich wie viel microRNA (-122) ist in der Zelle vorhanden?

Die technischen Rahmenbedingungen ermöglichten in dieser Arbeit die gleichzeitige Erhebung von zwei Parametern, sodass der neuen Erkenntnis über Virus-Wirt-Interaktionen hier eine Limitierung gesetzt ist. Bei dem Versuch einer gleichzeitigen Antikörperfärbung mit CK-18 zur Differenzierung von humanen und murinen Zellen besteht noch Entwicklungspotenzial. Im Allgemeinen ist die Erhebung aller vier Parameter in einem Schnittbild aber durchaus möglich.

Das technische Verfahren der hier erstellten Hybridisierungsbilder zeigt also zwei (prinzipiell lösbare) Einschränkungen auf:

- Eine infizierte Zelle ist zwar eindeutig human, eine nicht-infizierte Zelle ist jedoch nicht eindeutig murin, da in diesem Mausmodell nicht immer eine 100% Infektionsrate der humanen Hepatozyten erreicht wird (die HBV/HEV - Infektionen liefern eher hohe Raten an positiven Zellen, die HCV/HDV - Infektionen eher niedrige Raten, wie auch im Ergebnisteil ersichtlich).
- Eine nicht infizierte Zelle mit wenig miR-122 kann nicht eindeutig als Hepatozyt identifiziert werden

Nachfolgende Studien und Versuche müssen diese Ungenauigkeit eliminieren, indem alle vier o.g. Informationen gleichzeitig in einem Bild oder aber in direkt aufeinander folgenden Gewebeschnitten erhoben werden. Somit könnten potenzielle Korrelationen aufgezeigt werden. Darüber hinaus muss ein verlässlicher, möglicherweise automatisierter Prozess zur Auszählung der vielen Leuchtsignale etabliert werden. Hier ist je nach Bildausschnitt von einigen Hundert bis mehrere Tausend zu wertenden Signalen auszugehen.

Um dabei eine statistische Signifikanz zu erreichen, muss (wie oben beschrieben) eine größere Versuchsgruppe aus einheitlichen Bedingungen eingeschlossen werden.

Ebenfalls als gut geeignet herausgestellt hat sich die PCR Messung frei im Serum zirkulierender microRNA mittels Spike-Verfahren nach vorheriger Amplifizierung. Hier war der semi-quantitative Nachweis (in Form eine Relativierung zur Spike-Kontrolle) und theoretisch damit auch eine absolute Quantifizierung möglich.

Die Messung von miR-122 im Serum von Vertebraten ist ein in der Literatur bereits vielfach aufgegriffenes Thema. Um nur wenige Beispiele zu nennen kann eine Studie aus Münster erwähnt werden: Darin wurde in einer Population von Ratten eine

fulminante Hepatitis durch Kupfer-Überdosierung hervorgerufen. Neben den üblichen, laborchemischen Parametern eines Leberversagens (ALT, AST, Bilirubin) wurde auch miR-122 im Serum bestimmt. Letzterer Parameter konnte in einer Vielzahl der Fälle (77,8%) das Leberversagen bereits 2 Wochen vor den üblichen Parametern zuverlässig indizieren. Ebenso zuverlässig sank der Wert nach Transplantation von Hepatozyten in den überlebenden Tieren wieder ab (Siaj et al., 2012).

In einer noch größeren Kohorte aus Mäusen und mehreren hundert Menschen konnte 2015 diese Beobachtung bestätigt werden. Es zeigte sich, dass die miR-122 Konzentration im Serum – unabhängig von der Ätiologie - streng mit einem Untergang von Hepatozyten korreliert war, nicht mit dem Vorhandensein einer chronischen Lebererkrankung als solcher (Roderburg et al., 2015).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu miR-122 im murinen Serum verdeutlichen die hohe Effizienz und gute Durchführbarkeit des Messverfahrens inklusive vorheriger Amplifikation der microRNA und anschließender Umschreibung in die stabile cDNA-Form. Auffällig war der erhöhte Wert in den beiden gemessenen Seren der Tiere mit HBV-Infektion. Unter Berücksichtigung o.g. Studien wäre in diesen Tieren von einer akuten Leberschädigung auszugehen. Ob dem tatsächlich so ist und ob die anderen Infektionstypen im Mausmodell geringere Leberschädigungen hervorrufen, ließe sich wahrscheinlich mit erweiterten Experimenten ergründen.

Dabei wäre eine Gegenüberstellung von miR-122 im Serum, enzymatischen Parametern (ALT, AST, gGT), Bilirubin und histologischer Aufarbeitung notwendig – ähnlich dem Studiendesign in beiden o.g. Publikationen.

Unklar ist bisweilen der Einfluss des uPA/SCID-Phänotyps auf die Freisetzung von miR-122 ins Serum.

Es zeigt sich also, dass die Anwesenheit oder nicht-Anwesenheit von microRNA im Serum durchaus diagnostisches und prognostisches Potenzial hat. Jüngere Forschungsprojekte fokussieren jedoch stärker auf die Mechanismen der Freisetzung von microRNA. Der Großteil der microRNA in Serum (und anderen Körperflüssigkeiten) scheint tatsächlich frei, d.h. außerhalb von Exosomen vorzukommen. Die RNA ist dabei über das AGO-Protein in den RISC-Komplex integriert und dadurch gegenüber RNAsen stabil. Diese Menge an freien microRNA wird a.e. durch beschädigte Zellen während des Zellunterganges ausgestoßen. Ein

geringerer aber signifikanter Anteil microRNA liegt auch in sog. *extracellular vesicles* (EV) vor, deren Freisetzung und Auswirkung auf die rezipierenden Zellen Gegenstand intensiver Forschung sind (Turchinovich, Weiz, Langheinz, & Burwinkel, 2011). Neueste Arbeiten relativieren den para- bzw. endokrinen Effekt der EV-assoziierten microRNA. Eine Studie von 2020 findet Hinweise, dass die EV ihre (ohnehin sehr geringfügige) microRNA-Ladung nur in äußerst geringem Umfang an andere Zellen weitergeben werden (Albanese et al., 2020).

Um die Pathophysiologie der HBV-Infektion auch auf Ebene des microRNA-Netzwerkes zu verstehen, bedarf es einer Palette an Methoden, welche aktuell kosten- und arbeitsintensiv sind. Bei korrekter Durchführung sind jedoch dank Amplifikationstechnik auch kleinste Mengen microRNA mittels rtPCR sicher nachweisbar. Darauf aufbauend ist die in-situ-Hybridisierung in der Lage, Muster der microRNA Expression zellgenau zu visualisieren. Um belastbare Studienaussagen zu generieren, braucht es große Versuchsgruppen, streng standardisierte Bedingungen und strikte Ein- und Ausschlusskriterien der Proben.

Die Einsatzmöglichkeiten der Methoden sind breit. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich miR-122 beleuchtet, was bisweilen noch hunderte weitere microRNA im Zusammenhang mit viralen Hepatitiden und den chimären uPA/SCID Mäusen unbeobachtet lässt – es besteht daher ein großes Erkenntnispotenzial.

Gerade das Thema Hepatitis B bietet noch viel Raum für Entdeckungen, da bis dato die Mechanismen der Chronifizierung nicht vollständig erklärt werden konnten – vielleicht liefert in Zukunft eine microRNA den entscheidenden Hinweis.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

(Deutsch)

- Das Amplifizierungsverfahren von microRNA vor rtPCR hat sich bewährt, hiermit konnten z.B. in den humanen NASH-Biopsien oder murinen Seren auch kleinste Mengen microRNA nachgewiesen werden.
- Die Quantifizierung spezifischer microRNA in Bezug auf die HBV-Infektion stellt sich in chimären Mausmodellen schwierig dar, weil relevante microRNA Spezies-übergreifend konserviert sind.
- Daher sind quantitative PCR-Analysen von microRNA bei chimären Lebern weniger aussagekräftig.
- Gut geeignet ist die quantitative rtPCR mit exogener Spike-Kontrolle auch zur Detektion von microRNA im Serum, jedoch kann hier ebenfalls die Ursprungsspezies der microRNA nicht differenziert werden.
- Es ergeben sich Hinweise, dass eine HBV Infektion in chimären Mäusen mit erhöhter miR-122 Konzentration im Serum einhergehen könnte.
- Vielversprechend für den Einsatz an Lebergewebe ist daher der Ansatz einer microRNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.
- Im uPA/SCID chimären Mausmodell scheinen murine Hepatozyten deutlich mehr miR-122 zu exprimieren als die repopulierenden, humanen Zellen.
- Bei HBV/HDV-Koinfektion weisen die infizierten Zellen bildmorphologisch eine sehr geringe Expression von miR-122 auf (ähnlich dem Niveau HCV-infizierter Zellen).
- Hepatische, nicht-parenchymale Zellen (NPC) sind nahezu frei von miR-122
- In der Gesamtmenge des Lebergewebes (incl. NPC) ist miR-122 nicht dominant.

(English)

- The amplification of microRNA prior to rtPCR has proven helpful, even smallest amounts of microRNA could be quantified for example in our human NASH-biopsies or murine sera.
- Quantification of specific microRNA related to HBV infection is challenging in the chimeric mouse model, for relevant miRs are highly conserved among most species.

- Therefore, quantitative rtPCR data for microRNA in chimeric mice livers should be reviewed critically.
- Quantitative rtPCR showed excellent feasibility in combination with exogenous spike controls for the detection of microRNA in murine sera. However, there is again no way to discriminate miRs of murine origin from human miRs.
- There is first indications that an HBV infection could lead to a release of miR-122 in the sera of chimeric mice.
- Fluorescence-in-situ-hybridization (FISH) of microRNA in hepatic tissue is another promising approach:
 - Murine hepatocytes in uPA/SCID chimeric mice seem to express higher amounts of miR-122 compared to their human counterpart.
 - In HBV/HDV co-infection, the infected cells show a very low amount of intracellular miR-122 (seen in FISH, comparable to HCV infected cells).
 - Hepatic non-parenchymal cells (NPC) are almost free from miR-122.
 - Regarding the whole of hepatic tissue (including NPC), miR-122 is not predominant.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADAM10 - *adistintegrin and metalloprotease family 10*

AP - alkalische Phosphatase

cccDNA, covalently closed circular DNA

CAM - capsid assembly modulator

cDNA - complementary DNA

ceRNA - *competing endogenous RNA*

CT - cycle threshold

DHV - duck hepatitis virus

DNA - deoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure

EDC - 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

ELISA - ***Enzyme-Linked Immunosorbent Assay***

EV - Extracellular vesicle

FISH - Fluoreszenz in situ Hybridisierung

GAPDH - Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GSHV - ground squirrel hepatitis virus

hACTB - humanes Aktin beta

hamp - hepcidin antimicrobial peptide

HBcAg - hepatitis B core antigen

HBeAg - hepatitis B envelope antigen

HBsAg - hepatitis B surface antigen

HBxAg - hepatitis B x antigen

hB2M - humanes beta-2-Mikroglobulin

HBV - Hepatitis B Virus

HCV - Hepatitis C Virus

HCC - Hepatocellular carcinoma / Hepatozelluläres Karzinom

HDV - Hepatitis D Virus

HEV - Hepatitis E Virus

HIV - human immunodeficiency virus

hrc - histidine rich calcium binding protein

Igf1R - *insulin-like growth factor 1* Rezeptor

ISH - in-situ-Hybridisierung

LNA - locked nucleic acid

miR - microRNA
mRNA - messenger RNA
NPC - nonparenchymal cell
NTCP - *Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide*
ORF - open reading frame
PFB - PTTB-binding-factor
PBS - phosphate buffered saline
PCR - polymerase chain reaction / Polymerasekettenreaktion
PFA - Paraformaldehyd
pgRNA - pre-genomic RNA
RAG2 - recombination activating gene 2
rcDNA - relaxed circular DNA
RISC – rna-induced silencing complex
RNA - ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RNAi - RNA-interference
rtPCR - real time PCR
SCID - severe combined immunodeficiency
SRF - serum response factor
uPA - urokinase-type-plasminogen-activator
UTR - untranslatierte Region
uPA - urokinase-type plasminogen activator
WHO - world health organisation / Weltgesundheitsorganisation
WHV - woodchuck hepatitis virus

7 Literaturverzeichnis

Internetquellen:

1. Deutsches Zentrum zum Schutz von Versuchstieren. URL:

https://www.bf3r.de/de/verwendung_von_versuchstieren_im_jahr_2020-288932.html

Stand 23.07.2022 10:00 Uhr

2. QIAGEN. URL:

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/mirna/mirneasy-kits/>

Stand 23.07.2022 10:00 Uhr

3. Nature. Peng et al. 2016. URL:

<https://www.nature.com/articles/sigtrans20154/figures/1>

Stand 23.07.2022 10:15 Uhr

Albanese, M., Chen, Y. F. A., Hüls, C., Gärtner, K., Tagawa, T., Keppler, O. T., ...

Hammerschmidt, W. (2020). Micro RNAs are minor constituents of extracellular vesicles and are hardly delivered to target cells. *BioRxiv*.

<https://doi.org/10.1101/2020.05.20.106393>

Bai, S., Nasser, M. W., Wang, B., Hsu, S. H., Datta, J., Kutay, H., ... Ghoshal, K.

(2009). MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *Journal of Biological Chemistry*.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016774>

Baker, L. A., Lee, K. C. L., Palacios Jimenez, C., Alibhai, H., Chang, Y.-M., Leckie, P.

J., ... Jalan, R. (2015). Circulating microRNAs Reveal Time Course of Organ Injury in a Porcine Model of Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. *PLOS ONE*,

10(5), e0128076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128076>

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.

Cell, *116*(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)

Blanco-Domínguez, R., Sánchez-Díaz, R., de la Fuente, H., Jiménez-Borreguero, L.

J., Matesanz-Marín, A., Relaño, M., ... Martín, P. (2021). A Novel Circulating MicroRNA for the Detection of Acute Myocarditis. *New England Journal of Medicine*.

<https://doi.org/10.1056/nejmoa2003608>

Brezillon, N., Brunelle, M. N., Massinet, H., Giang, E., Lamant, C., DaSilva, L., ...

Kremsdorf, D. (2011). Antiviral activity of Bay 41-4109 on hepatitis B virus in humanized Alb-uPA/SCID mice. *PLoS ONE*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025096>

- Castoldi, M., Spasic, M. V., Altamura, S., Elmén, J., Lindow, M., Kiss, J., ... Muckenthaler, M. U. (2011). The liver-specific microRNA miR-122 controls systemic iron homeostasis in mice. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI44883>
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M. A., ... Taylor, J. M. (2004). miR-122, a Mammalian Liver-Specific microRNA, is Processed from hcr mRNA and May Downregulate the High Affinity Cationic Amino Acid Transporter CAT-1. *RNA Biology*, 1(2), 106–113.
<https://doi.org/10.4161/rna.1.2.1066>
- Chen, C. J., Yang, H. I., Su, J., Jen, C. L., You, S. L., Lu, S. N., ... Iloeje, U. H. (2006). Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA Level. *Journal of the American Medical Association*.
<https://doi.org/10.1001/jama.295.1.65>
- Chisari, F. V., Pinkert, C. A., Milich, D. R., Filippi, P., Mclachlan, A., Palmiter, R. D., & Brinster, R. L. (1985). A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.3865369>
- Coulouarn, C., Factor, V. M., Andersen, J. B., Durkin, M. E., & Thorgeirsson, S. S. (2009). Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*, 28(40), 3526–3536. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.211>
- Dandri, M., Burda, M. R., Török, E., Pollok, J. M., Iwanska, a, Sommer, G., ... Petersen, J. (2001). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 33(4), 981–988.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2001.23314>
- Dandri, Maura, Burda, M. R., Will, H., & Petersen, J. (2000). Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA. *Hepatology*.
<https://doi.org/10.1053/jhep.2000.8701>
- Dandri, Maura, & Petersen, J. (2012). Chimeric mouse model of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 56(2), 493–495.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.05.037>
- De Franchis, R., Meucci, G., Vecchi, M., Tatarella, M., Colombo, M., Del Ninno, E., ... Ronchi, G. (1993). The natural history of asymptomatic hepatitis B surface

- antigen carriers. *Annals of Internal Medicine*, 118(3), 191–194.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-118-3-199302010-00006>
- Dean, J., Bowden, S., & Locarnini, S. (1995). Reversion of duck hepatitis B virus DNA replication in vivo following cessation of treatment with the nucleoside analogue ganciclovir. *Antiviral Research*. [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(94\)00081-I](https://doi.org/10.1016/0166-3542(94)00081-I)
- Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., ... Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.01.005>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806–811.
<https://doi.org/10.1038/35888>
- Guidotti, L. G., Matzke, B., Schaller, H., & Chisari, F. V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *Journal of Virology*.
- Hou, J., Lin, L., Zhou, W., Wang, Z., Ding, G., Dong, Q., ... Cao, X. (2011). Identification of miRNomes in Human Liver and Hepatocellular Carcinoma Reveals miR-199a/b-3p as Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.001>
- Hsu, S. H., Wang, B., Kota, J., Yu, J., Costinean, S., Kutay, H., ... Ghoshal, K. (2012). Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI63539>
- Klumpp, K., Shimada, T., Allweiss, L., Volz, T., Lütgehetmann, M., Hartman, G., ... Dandri, M. (2018). Efficacy of NVR 3-778, Alone and In Combination With Pegylated Interferon, vs Entecavir In uPA/SCID Mice With Humanized Livers and HBV Infection. *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.10.017>
- Köberle, V., Kronenberger, B., Pleli, T., Trojan, J., Imelmann, E., Peveling-Oberhag, J., ... Waidmann, O. (2013). Serum microRNA-1 and microRNA-122 are prognostic markers in patients with hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.002>
- Kohno, T., Tsuge, M., Murakami, E., Hiraga, N., Abe, H., Miki, D., ... Chayama, K. (2014). Human microRNA hsa-miR-1231 suppresses hepatitis B virus replication

- by targeting core mRNA. *Journal of Viral Hepatitis*.
<https://doi.org/10.1111/jvh.12240>
- Kong, G., Zhang, J., Zhang, S., Shan, C., Ye, L., & Zhang, X. (2011). Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PLoS ONE*.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019518>
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M., & Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs.' *Nature*, 438(7068), 685–689. <https://doi.org/10.1038/nature04303>
- Kunden, R. D., Khan, J. Q., Ghezelbash, S., & Wilson, J. A. (2020). The role of the liver-specific microrna, mirna-122 in the hcv replication cycle. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21165677>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse. *Current Biology*, 12(9), 735–739. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00809-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00809-6)
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Li, C., Wang, Y., Wang, S., Wu, B., Hao, J., Fan, H., ... Meng, S. (2013). Hepatitis B Virus mRNA-Mediated miR-122 Inhibition Upregulates PTTG1-Binding Protein, Which Promotes Hepatocellular Carcinoma Tumor Growth and Cell Invasion. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.02831-12>
- Lichter. (1969). Chimpanzee antibodies to Australia antigen. *Nature*.
- Lok, A. S. F., & McMahon, B. J. (2009). Chronic hepatitis B: Update 2009. *Hepatology*, 50(3), 661–662. <https://doi.org/10.1002/hep.23190>
- Luna, J. M., Scheel, T. K. H., Danino, T., Shaw, K. S., Mele, A., Fak, J. J., ... Darnell, R. B. (2015). Hepatitis C virus RNA functionally sequesters miR-122. *Cell*.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.025>
- Lütgehetmann, M., Bornscheuer, T., Volz, T., Allweiss, L., Bockmann, J., Pollok, J. M., ... Dandri, M. (2011). Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon- α in chimeric mice. *Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.02.057>
- Lütgehetmann, M., Mancke, L. V., Volz, T., Helbig, M., Allweiss, L., Bornscheuer, T., ... Dandri, M. (2012). Humanized chimeric uPA mouse model for the study of

- hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology*.
<https://doi.org/10.1002/hep.24758>
- Mason, W. S., Cullen, J., Moraleda, G., Saputelli, J., Aldrich, C. E., Miller, D. S., ...
 Jilbert, A. R. (1998). Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology*.
<https://doi.org/10.1006/viro.1998.9150>
- Menne, S., Cote, P. J., Korba, B. E., Butler, S. D., George, A. L., Tochkov, I. A., ...
 Tennant, B. C. (2005). Antiviral effect of oral administration of tenofovir disoproxil
 fumarate in woodchucks with chronic woodchuck hepatitis virus infection.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2720-2728.2005>
- Minor, M. M., & Slagle, B. L. (2014). Hepatitis B virus HBx protein interactions with
 the ubiquitin proteasome system. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v6114683>
- Möröy, T., Etiemble, J., Bougueleret, L., Hadchouel, M., Tiollais, P., & Buendia, M. A.
 (1989). Structure and expression of hcr, a locus rearranged with c-myc in a
 woodchuck hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 4(1), 59–65. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2536918>
- Möröy, Tarik, Marchio, A., Etiemble, J., Trépo, C., Tiollais, P., & Buendia, M.-A.
 (1986). Rearrangement and enhanced expression of c-myc in hepatocellular
 carcinoma of hepatitis virus infected woodchucks. *Nature*, 324(6094), 276–279.
<https://doi.org/10.1038/324276a0>
- Nguyen, M. H., Wong, G., Gane, E., Kao, J. H., & Dusheiko, G. (2020). Hepatitis B
 virus: Advances in prevention, diagnosis, and therapy. *Clinical Microbiology
 Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-19>
- Papatheodoridis, G. V., Chan, H. L. Y., Hansen, B. E., Janssen, H. L. A., &
 Lampertico, P. (2015). Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B:
 Assessment and modification with current antiviral therapy. *Journal of
 Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.01.002>
- Peters, M., Vierling, J., Gershwin, M. E., Milich, D., Chisari, F. V., & Hoofnagle, J. H.
 (1991). Immunology and the liver. *Hepatology*.
<https://doi.org/10.1002/hep.1840130529>
- Quasdorff, M., & Protzer, U. (2010). Control of hepatitis B virus at the level of
 transcription. *Journal of Viral Hepatitis*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01315.x>
- Robinson, W. S. (1980). Genetic Variation Among Hepatitis B and Related Viruses.

- Annals of the New York Academy of Sciences*, 354(1), 371–378.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27978.x>
- Roderburg, C., Benz, F., Vargas Cardenas, D., Koch, A., Janssen, J., Vucur, M., ... Luedde, T. (2015). Elevated miR-122 serum levels are an independent marker of liver injury in inflammatory diseases. *Liver International*.
<https://doi.org/10.1111/liv.12627>
- Sandgren, E. P., Palmiter, R. D., Heckel, J. L., Daugherty, C. C., Brinster, R. L., & Degen, J. L. (1991). Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell*, 66(2), 245–256.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90615-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90615-6)
- Siaj, R., Sauer, V., Stöppeler, S., Ger, J., Spiegel, H. U., Kohler, G., ... Schmidt, H. H. J. (2012). Longitudinal analysis of serum miR-122 in a rat model of Wilson's disease. *Hepatology International*. <https://doi.org/10.1007/s12072-012-9348-5>
- Torre, P., Aglitti, A., Masarone, M., & Persico, M. (2021). Viral hepatitis: Milestones, unresolved issues, and future goals. *World Journal of Gastroenterology*.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i28.4603>
- Tsai, W. C., Hsu, S. Da, Hsu, C. S., Lai, T. C., Chen, S. J., Shen, R., ... Tsou, A. P. (2012). MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *Journal of Clinical Investigation*.
<https://doi.org/10.1172/JCI63455>
- Tsuge, M., Hiraga, N., Takaishi, H., Noguchi, C., Oga, H., Imamura, M., ... Yoshizato, K. (2005). Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis B virus. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.20892>
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- Waidmann, O., Bihrer, V., Pleli, T., Farnik, H., Berger, A., Zeuzem, S., ... Piiper, A. (2012). Serum microRNA-122 levels in different groups of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Viral Hepatitis*.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01536.x>
- Wang, X., Huang, Y., Zhuang, H., Qian, Y., Zhao, Q., Yang, L., ... Liu, Y. (2015). Downregulation of MicroRNA-1 is Associated with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Laboratory*.
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2015.150319>

- Wei, L., & Ploss, A. (2021). Mechanism of hepatitis b virus cccDNA formation. *Viruses*.
<https://doi.org/10.3390/v13081463>
- WHO. (2017). *Global Hepatitis Report, 2017*. World Health Organisation.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.11.010>
- Wieland. (2015). The Chimpanzee Model for Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- World Health Organisation. (2021). *Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections 2021: accountability for the global health sector strategies, 2016–2021*. World Health Organisation.
- Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., ... Li, W. (2012). Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>
- Yang, N., Liu, K., Yang, M., & Gao, X. (2021). CeRNAs in Cancer: Mechanism and Functions in a Comprehensive Regulatory Network. *Journal of Oncology*.
<https://doi.org/10.1155/2021/4279039>
- Yang, X., Li, H., Sun, H., Fan, H., Hu, Y., Liu, M., ... Tang, H. (2017). Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. *Journal of Virology*.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01919-16>

8 Abbildungsverzeichnis

- | | |
|---------------|---|
| Abbildung 1.1 | Das HBV Genom |
| Abbildung 1.2 | Das UPA/SCID Mausmodell |
| Abbildung 2 | Synthese und Funktion von microRNA |
| Abbildung 3 | cDNA Synthese aus microRNA |
| Abbildung 4 | Amplifikation von microRNA aus murinen Lebern |
| Abbildung 5 | Amplifikationserfolg bei rtPCR verschiedener microRNA in humanen Leberbiopsien |
| Abbildung 6 | Vergleich von HBV-infizierten mit nicht infizierten Mäusen hinsichtlich verschiedener, hepatischer microRNA |
| Abbildung 7 | Hepatische Expression der miR-122 in Mäusen mit viralen Hepatitiden unterschiedlichen Typs |

- Abbildung 8 Real-Time-PCR der (Spike-)cel-miR-39, die einer Gruppe von 25 murinen Serum-Proben künstlich hinzugefügt wurde
- Abbildung 9 Real-Time-PCR der miR-122 in murinem / humanem Serum
- Abbildung 10 Hybridisierung von miR-122 in chimären UPA/SCID Mäuselebern mittels AP-Farbumsatz (alkalische Phosphatase) – frühes Versuchsstadium
- Abbildung 11 Lebergewebe und Milzgewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten. ISH mittels AP-Farbumsatz (alkalische Phosphatase) und Alexa-488 Sonde – frühes Stadium
- Abbildung 12 Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten. ISH im Verbesserten Protokoll mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)
- Abbildung 13 Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-C Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)
- Abbildung 14 Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-D Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)
- Abbildung 15 Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-B Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)
- Abbildung 16 Lebergewebe einer UPA/SCID Maus nach Repopulierung mit humanen Hepatozyten und Hepatitis-E Infektion. ISH mittels Alexa-Fluoreszenz-Sonden (viewRNA plus)

9 Danksagung

Danksagung aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Lebenslauf

Lebenslauf aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: