

Aus der Klinik für Innere Medizin II,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Jörn Schattenberg

**Über die microRNA und mRNA-Expressionsmuster beim Krankheitsbild
des akut-auf-chronischen-Leberversagens**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von Maximilian Imre Tessenyi

geboren am 03.02.1996 in Wuppertal

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung.....	1
2 Summary.....	3
3 Einleitung.....	5
3.1 Leberzirrhose.....	5
3.1.1 Definition.....	5
3.1.2 Epidemiologie.....	5
3.1.3 Ätiologie.....	6
3.1.4 Pathophysiologie.....	7
3.2 Akut-auf-chronisches Leberversagen (ACLF).....	8
3.2.1 Definition.....	8
3.2.2 Ätiologie.....	11
3.2.3 Pathophysiologie.....	12
3.2.4 Diagnose.....	18
3.2.5 Therapie.....	19
3.3 MicroRNAs.....	20
3.3.1 Biogenese.....	20
3.3.2 Posttranskriptionelle Genregulation durch microRNAs.....	22
3.3.3 MicroRNAs als Biomarker.....	24
3.3.4 MicroRNAs und ACLF.....	25
3.4 Fragestellung.....	26
4 Materialien und Untersuchungsgut.....	28
4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	28
4.2 Kits.....	29
4.3 TaqMan MicroRNA-Assays.....	29
4.4 Instrumente und Geräte.....	30
4.5 Mäuse.....	30
4.5.1 <i>C57BL/6J</i> -Wiltyp Mäuse.....	30
4.5.2 <i>Abcb4</i> -defiziente Mäuse.....	31
4.6 Humane Serumproben.....	31
5 Methoden.....	32

5.1	Expressionsanalysen am Mausmodell.....	32
5.1.1	Allgemeines zum ACLF-Mausmodell.....	32
5.1.2	Strukturierung der Expressionsanalysen	33
5.1.3	mRNA-Sequenzierung.....	34
5.1.4	microRNA PCR-Array	38
5.2	microRNA-mRNA-Interaktionen.....	42
5.3	Humane Serumproben	43
5.4	Auswahl der Patientenkohorten.....	43
5.4.1	MicroRNA-Quantifizierung	44
5.5	Statistik	52
6	Ergebnisse.....	54
6.1	Einführung zu den Ergebnissen im Mausmodell.....	54
6.2	mRNA-Sequenzierung im Mausmodell.....	54
6.2.1	Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung.....	54
6.2.2	Differentially expressed Genes (DEGs)	57
6.2.3	Induzierte Gene in den ACLF-Mäusen	59
6.2.4	Reprimierte Gene in den ACLF-Mäusen.....	63
6.2.5	Gene Ontology-Anreicherungsanalysen [Gene Ontology (GO) term enrichment].....	63
6.2.6	KEGG-Pfadanalyse [KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway]	65
6.3	microRNA-Expressionsprofile im Mausmodell.....	66
6.3.1	Volcano-Plots	68
6.3.2	Balkendiagramme	71
6.4	microRNA-mRNA-Interaktion.....	73
6.5	Patientenkohorte mit Leberzirrhose	74
6.5.1	MicroRNA-Expressionsniveaus bei Patienten mit Leberzirrhose	75
6.5.2	Expression von <i>hsa-let-7c-5p</i> , <i>hsa-mir-21a-5p</i> , <i>hsa-mir-25-3p</i> und <i>hsa-mir-29c-3p</i>	76
6.5.3	Expression von <i>let-7b-5p</i> , <i>mir-23a-3p</i> und <i>mir-148a-3p</i>	77
6.6	Patientenkohorte mit ACLF	79
6.6.1	MicroRNA-Expressionsniveaus bei Patienten mit ACLF.....	80
6.6.2	Laborchemische und klinische Daten der Patienten.....	82
6.6.3	Korrelation des Serumspiegels von <i>mir-148a-3p</i> mit laborchemischen und klinischen Daten der ACLF-Patienten	87
6.6.4	Überlebenszeitanalysen der ACLF-Patienten.....	90
7	Diskussion	91
	mRNA-Sequenzierung: Inflammatorisches Genexpressionsmuster der ACLF-Mäuse	93
	Muster inflammatorischer microRNAs im ACLF-Mausmodell.....	95

microRNA-mRNA-Interaktionen	99
<i>Mir-148a-3p</i> als Auslöser-unabhängiger Biomarker für das akut-auf-chronische Leberversagen	99
Der Serumspiegel von <i>let-7b-5p</i> ist bei Patienten mit Leberzirrhose erniedrigt	102
Erkenntnis und Ausblick.....	102
8 Literaturverzeichnis.....	105
9 Publikationen.....	114
10 Danksagung	115
11 Curriculum vitae	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarischer Überblick der Ursachen der Leberzirrhose	6
Abbildung 2: Ätiologie des akut-auf-chronischen Leberversagens	11
Abbildung 3: Pathophysiologie des akut-auf-chronischen Leberversagens	17
Abbildung 4: Therapie des ACLF	19
Abbildung 5: Biogenese der microRNAs	22
Abbildung 6: mRNA-Abbau durch microRNAs.....	24
Abbildung 7: Arbeitsschritte Mausmodell	34
Abbildung 8: Ergebnisse des Agilent Bioanalyzer 2 100	36
Abbildung 9: MicroRNAs im MiMM-116ZC-miScript PCR-Array	41
Abbildung 10: Arbeitsschritte humane Serumproben.....	44
Abbildung 11: qPCR mit TaqMan	48
Abbildung 12: Ct-Wert	50
Abbildung 13: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Sequenzierung an Lebergewebe von jeweils drei Tieren aus jeder Gruppe des Mausmodells.....	56
Abbildung 14: Differentially expressed Genes im Venn-Diagramm.....	58
Abbildung 15: Am stärksten angereicherte Kategorien der Gene Ontology-Anreicherungsanalysen biologischer Prozesse mit GeneTrail.....	64
Abbildung 16: Am stärksten angereicherte Kategorien der KEGG-Pfadanalyse mit GeneTrail.....	65
Abbildung 17: Heatmap der Expression der 84 leberspezifischen microRNAs zwischen den vier Gruppen des Mausmodells	67
Abbildung 18: Volcano-Plot (<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS vs. WT + NaCl).....	68
Abbildung 19: Volcano-Plot (<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS vs. <i>Abcb4</i> -Defizienz + NaCl).....	69
Abbildung 20: Volcano-Plot (<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS vs. WT + LPS)	70
Abbildung 21: microRNA Expressionsprofile.....	71
Abbildung 22: microRNA-mRNA Interaktions-Graph	73
Abbildung 23: Expression der microRNAs <i>let-7c-5p</i> , <i>mir-21a-5p</i> , <i>mir-25-3p</i> und <i>mir-29c-3p</i> in humanen Serumproben.....	76
Abbildung 24: Expression von microRNA <i>let-7b-5p</i> in humanen Serumproben.....	77
Abbildung 25: Expression von microRNA <i>mir-23a-3p</i> in humanen Serumproben.....	78
Abbildung 26: Expression von <i>mir-148a-3p</i> in humanen Serumproben	78
Abbildung 27: Expression von <i>mir-148a-3p</i> in humanen Serumproben	80
Abbildung 28: Expression von <i>mir-148a-3p</i> bei Patienten mit ACLF-Grad I und II.....	81
Abbildung 29: Expression von <i>mir-148a-3p</i> in Abhängigkeit davon, ob das ACLF durch eine bakterielle Infektion ausgelöst wurde	82
Abbildung 30: CRP und Leukozyten der Patienten	83

Abbildung 31: Bilirubin und Albumin der Patienten	83
Abbildung 32: ALAT und ASAT der Patienten	84
Abbildung 33: Kreatinin und Natrium der Patienten	85
Abbildung 34: INR der Patienten.....	85
Abbildung 35: Child-Pugh und MELD-Scores der Patienten.....	86
Abbildung 36: Korrelation der Serumspiegel von <i>mir-148a-3p</i> mit CRP und Leukozyten	87
Abbildung 37: Korrelation der Serumspiegel von <i>mir-148a-3p</i> mit Albumin, Bilirubin, ASAT und ALAT	88
Abbildung 38: Korrelation der Serumspiegel von <i>mir-148a-3p</i> mit Kreatinin und Natrium	89
Abbildung 39: Korrelation der Serumspiegel von <i>mir-148a-3p</i> mit dem INR.....	89
Abbildung 40: Korrelation der Serumspiegel von <i>mir-148a-3p</i> mit Child-Pugh und MELD-Scores...	90
Abbildung 41: Kaplan-Meier Kurve der Überlebensraten der ACLF-Patienten	90
Abbildung 42: Expression des Toll-like-Rezeptors 7 in Lebergewebe der Versuchstiere	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CLIF-SOFA Score der Europäischen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber	9
Tabelle 2: Einteilung des ACLF in unterschiedliche Schweregrade.....	10
Tabelle 3: Mortalität des ACLF	11
Tabelle 4: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 5: Kits Untersuchungsgut Mausleber	29
Tabelle 6: Kits Untersuchungsgut humane Serumproben.....	29
Tabelle 7: microRNA-Assays für die humanen Serumproben	30
Tabelle 8: Instrumente und Geräte	30
Tabelle 9: Das Mausmodell	32
Tabelle 10: Nomenklatur der Versuchsgruppen.....	33
Tabelle 11: Reaktionsansatz cDNA-Synthese aus microRNA	40
Tabelle 12: Reaktionsschritte im Thermozykler.....	40
Tabelle 13: Reaktionsansatz microRNA Array.....	41
Tabelle 14: PCR-Zyklus.....	42
Tabelle 15: Patientenkohorte LHomFor.....	43
Tabelle 16: Patientenkohorte ACLF	44
Tabelle 17: cDNA-Synthese Master-Mix	46
Tabelle 18: Reaktionsansatz cDNA-Synthese.....	46
Tabelle 19: Reaktionsschritte im Thermozykler.....	47
Tabelle 20: qPCR Inhalt der Wells	49

Tabelle 21: Beispielhafte Anordnung der Proben auf einer PCR-Platte.....	49
Tabelle 22: Berechnung des durchschnittlichen Ct-Wertes.....	51
Tabelle 23: Korrelation nach Cohen.....	52
Tabelle 24: Ätiologie der Leberschädigung im Mausmodell.....	54
Tabelle 25: Mit den Gruppen des Mausmodells korrespondierende Datenpunkte der Hauptkomponentenanalyse.....	55
Tabelle 26: Hochregulierte Differentially expressed Genes in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS).....	59
Tabelle 27: Herunterregulierte Differentially expressed Genes der Versuchstiere mit akut-auf-chronischem Leberschaden (<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS).....	63
Tabelle 28: Ergebnisse der Gene-Ontology Anreicherungsanalyse der biologische Prozesse.....	64
Tabelle 29: Ergebnisse der KEGG-Pfadanalyse.....	65
Tabelle 30: Fold-Change und p-Wert der microRNAs.....	72
Tabelle 31: Patientencharakteristika.....	75
Tabelle 32: Charakteristika der Patienten mit akut-auf-chronischen Leberversagen.....	79

Abkürzungsverzeichnis

μ l	<i>Mikroliter</i>
3'-UTR	<i>three prime untranslated region</i>
5'UTR	<i>five prime untranslated region</i>
<i>Abcb4</i>	<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member</i>
ACLF	<i>acute-on-chronic liver failure</i>
AGO	<i>Argonautenprotein</i>
ALAT	<i>Alanin-Aminotransferase</i>
ASAT	<i>Aspartat-Aminotransferase</i>
BI	<i>bakterielle Infektion</i>
CAID	<i>cirrhosis-associated immun dysfunction</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLIF	<i>chronic liver failure</i>
C _t	<i>cycle threshold</i>
dAMP	<i>Desoxyadenosinmonophosphat</i>
DCP2	<i>Decapping Protein 2</i>
DEGs	<i>differentially expressed genes</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
EASL	<i>Europäische Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber</i>
HE	<i>Hepatische Enzephalopathie</i>

HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HNA2	<i>Human Nonmercaptalbumin 2</i>
Hz	<i>Hertz</i>
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
IL-1ra	<i>Interleukin 1-Rezeptor-Antagonist</i>
IL-6,	<i>Interleukin-6</i>
IL-8	<i>Interleukin-8</i>
INR	<i>international normalized ratio</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
KG	<i>Körpergewicht</i>
KI	<i>Konfidenzintervall</i>
KO	<i>knockout</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MAD	<i>mittlerer arterieller Druck</i>
ml	<i>Milliliter</i>
mM	<i>Millimol</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
ng	<i>Nanogramm</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
PABP	<i>Poly(A)-Bindeprotein</i>
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PC1	<i>erste Hauptkomponente (engl. first principal component)</i>
PC2	<i>zweite Hauptkomponente (engl. second principal component)</i>
PCA	<i>Hauptkomponentenanalyse (engl. Principal Component Analysis)</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PSC	<i>Primär skleorsierende Cholangitis</i>
qPCR	<i>quantitative Echtzeit-PCR</i>
RIN	<i>RNA-Integritätsnummer</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Reverse Transkription</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor alpha</i>
U	<i>Enzymeinheit</i>
WT	<i>Wildtyp</i>
XNR1	<i>5'-3'-Exoribonuklease 1</i>

1 Zusammenfassung

Das akut-auf-chronische Leberversagen [Acute-on-chronic liver failure (ACLF)] ist ein Krankheitsbild, welches Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung betrifft und erst kürzlich als eigenständige Krankheitsentität definiert wurde. Die in Europa verbreitete Definition des ACLF nach der European Association for the Study of the Liver – Chronic Liver Failure (EASL-CLIF) beruht auf einer prospektiven Patientenstudie, welche insgesamt 1 343 Patienten einschloss. Diese Definition umfasst drei Komponenten: akute Dekompensation der Leberzirrhose, Ein- oder Mehrorganversagen und eine 28-Tage Mortalität > 15%. Nach dieser wegweisenden Publikation aus dem Jahre 2013 haben neuere Arbeiten weitere Charakteristika des ACLF ergründet. So entwickelt sich das ACLF häufig in engem zeitlichen Zusammenhang mit einem proinflammatorischen auslösenden Ereignis (z.B. alkoholische Hepatitis oder bakterielle Infektion), und es ist mit einer fulminanten systemischen Inflammation assoziiert [9,123]. Die Pathophysiologie des ACLF ist jedoch nur unvollständig verstanden, so kann beispielweise bei bis zu 44% der ACLF-Patienten kein auslösendes Ereignis identifiziert werden [99]. Ebenso sind die genaue Pathophysiologie der systemischen Inflammation und der Schädigungsmechanismus der extrahepatischen Organe nicht vollständig geklärt [10]. Aufgrund der hohen Dynamik des Krankheitsbildes und der Ermangelung kausaler Therapien ist das ACLF bis heute eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung mit einer schlechten Prognose. Diese Arbeit soll das microRNA- und mRNA-Expressionsmuster beim ACLF untersuchen. Hierdurch sollen die intrahepatischen biologischen Prozesse des ACLF besser verstanden werden und die Grundlage für kausale Therapien gelegt werden. Darüber hinaus soll zur Verbesserung der Diagnose des ACLF ein Biomarker identifiziert werden, welcher spezifisch für das Krankheitsbild ist.

In unserer Arbeitsgruppe war ein transgenes ACLF-Mausmodell etabliert worden, um das Zusammenwirken des akuten und chronischen Leberschadens auf mRNA- und microRNA-Ebene zu untersuchen. An Lebergewebe der ACLF Mäuse [*Abcb4*-Defizienz + LPS (intraperitoneale Lipopolysaccharid-Injektion)] wurden eine mRNA-Sequenzierung und microRNA-PCR-Arrays durchgeführt. Die Ergebnisse der mRNA-Sequenzierung wurden im Hinblick auf die zugrundeliegenden biologischen Prozesse ausgewertet. Als Kontrollgruppen dienten lebergesunde Wildtyp-Mäuse [WT + NaCl (intraperitoneale Natriumchlorid-Injektion)], Wildtyp-Mäuse mit akutem Leberschaden (WT + LPS) und Mäuse mit chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl). Im Zuge der microRNA-PCR-Arrays wurden sieben microRNAs identifiziert, welche sich als potentielle Biomarker zur frühzeitigen Diagnose des

ACLF eignen. Diese sieben microRNAs wurden anschließend in humanen Serumproben von Patienten mit Leberzirrhose, Leberzirrhose mit akuter bakterieller Infektion und ACLF (gesicherte Diagnose nach EASL-CLIF Definition) bestimmt. Als Kontrollgruppe dienten Serumproben von gesunde Probanden.

Im Rahmen der Tierversuche konnten 145 differentiell exprimierte Gene [Differentially expressed Genes (DEG)] identifiziert werden, welche beim ACLF intrahepatisch verändert exprimiert werden. Diese Gene sind vor allem an inflammatorischen Immunprozessen beteiligt. Zudem konnten sieben microRNAs identifiziert werden, die ebenso an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Im Zuge der Translation der Ergebnisse der microRNA-Analysen von Maus zu Mensch konnten die Ergebnisse für *miR-148a-3p* bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Serumspiegel von *mir-148a-3p* bei Patienten mit ACLF erhöht sind. Ferner korrelierten die Serumspiegel von *mir-148a-3p* positiv mit dem ACLF-Grad. Auch konnte gezeigt werden, dass bereits bei Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller Infektion die Serumspiegel von *mir-148a-3p* erhöht sind. Zudem war die Erhöhung der Serumspiegel von *mir-148a-3p* unabhängig davon, ob das ACLF durch eine bakterielle Infektion ausgelöst wurde oder nicht. Somit scheint diese microRNA ACLF unabhängig von seinem Auslöser anzuzeigen.

Die Ergebnisse der Tierversuche und der Patientenstudien legen nahe, dass die im Serum zirkulierende microRNA *mir-148a-3p* als robuster diagnostischer Marker für ACLF dienen kann. Zirkulierende *mir-148a-3p* vermag das Potential zu haben, die Entwicklung und Dynamik des ACLF nicht-invasiv zu erfassen, weshalb ihr diagnostisches Potential in weiteren Patientenstudien validiert werden sollte. Zudem konnte in den Tierversuchen ein intrahepatisches Genexpressionsmuster, bestehend aus 145 Genen, identifiziert werden, welches das ACLF vom gesunden Normalzustand, dem akuten und dem chronischen Leberversagen unterscheidet und somit Teil der molekularen Grundlagen des ACLF zu sein scheint. In unserer Arbeitsgruppe wird aktuell an der Validierung der Zielgene von *mir-148a-3p* in primären Hepatozyten unter ACLF-Bedingungen gearbeitet, um weitere diagnostische und therapeutische Möglichkeiten aufzuzeigen.

2 Summary

Acute-on-chronic liver failure (ACLF) is a condition that affects patients with chronic liver disease and has recently been defined as an independent disease entity. The definition of ACLF used in Europe according to the European Association for the Study of the Liver - Chronic Liver Failure (EASL-CLIF) criteria is based on a prospective patient study that included a total of 1343 patients. This definition includes three components: acute decompensation of liver cirrhosis, single or multiple organ failure and a 28-day mortality rate above 15%. Following this landmark publication in 2013, more recent publications have explored further characteristics of ACLF. For example, ACLF often develops in close temporal relation to a proinflammatory initiating event (e.g. alcoholic hepatitis or bacterial infection) and is associated with fulminant systemic inflammation.

However, the pathophysiology of ACLF is incompletely understood. In up to 50% of ACLF patients, no precipitating event can be identified. Similarly, the exact pathophysiology of the systemic inflammation and the mechanism of damage to extrahepatic organs has got to be defined. Due to the highly dynamic nature of the clinical picture and the lack of causal therapies, ACLF remains a major diagnostic and therapeutic challenge with poor prognosis. This thesis aimed to investigate microRNA and mRNA expression patterns in ACLF. This should provide a better understanding of the intrahepatic biological processes of ACLF and open avenues for better therapies. Furthermore, to improve diagnosis, a novel biomarker for ACLF should be identified.

In our research group, a transgenic ACLF mouse model was established to study the interaction of acute and chronic liver damage at the mRNA and microRNA level. Liver tissue from ACLF mice [*Abcb4*-deficiency + LPS (Lipopolysaccharide)] were subjected to mRNA sequencing and microRNA PCR arrays. The results of mRNA sequencing were evaluated in terms of the underlying biological processes. Liver-healthy mice [Wild-type (WT) + NaCl], mice with acute liver damage (WT + LPS) and mice with chronic liver damage (*Abcb4*-deficiency + NaCl) served as control groups. In microRNA-PCR arrays, seven microRNAs were identified that could represent potential biomarkers for ACLF. These seven microRNAs were then measured in human serum samples from patients with cirrhosis, cirrhosis plus acute bacterial infection, and ACLF (confirmed diagnosis according to EASL-CLIF criteria). Serum samples from healthy volunteers served as controls.

In the animal experiments, 145 Differentially expressed Genes (DEG) were identified, which are expressed differentially in ACLF. These genes are mainly involved in inflammatory mechanisms. The identified microRNAs were also previously described to play a role in inflammation. Translating the results of the microRNA analyses from mouse to human, the findings for *miR-148a-3p* could be confirmed. It could be demonstrated that serum levels of *mir-148a-3p* are increased in patients with ACLF. Furthermore, serum levels of *mir-148a-3p* correlated positively with ACLF grade. Serum levels of *mir-148a-3p* were also elevated in patients with cirrhosis and acute bacterial infection. Moreover, the increase in serum levels of *mir-148a-3p* was independent of whether ACLF was triggered by bacterial infection or not. Thus, they seem to indicate ACLF regardless of its trigger.

The results of the animal and patient studies suggest that circulating *mir-148a-3p* in serum can serve as a diagnostic marker for ACLF. Circulating *mir-148a-3p* appears to have the potential to detect the development and dynamics of ACLF non-invasively, so its diagnostic potential should be validated in further patient studies. In the animal studies an intrahepatic gene expression pattern consisting of 145 genes could be identified, which distinguishes ACLF from the healthy normal state, acute and chronic liver failure, and thus seems to be part of the molecular signature of ACLF. Our research group is currently working on the experimental validation of the target genes of *mir-148a-3p* in primary hepatocytes under ACLF conditions to develop further diagnostic and therapeutic options.

3 Einleitung

3.1 Leberzirrhose

Zum akut-auf-chronischen Leberversagen [Acute-on-chronic liver failure (ACLF)] kommt es, wenn auf eine chronisch vorgeschädigte Leber (i.d.R. durch Leberzirrhose) ein akutes, direkt oder indirekt, leberschädigendes Ereignis trifft. In der Folge verschlechtert sich die Leberfunktion erheblich und die Mortalität steigt stark an [117]. Somit ist das ACLF als eine schwerwiegende Komplikation der Leberzirrhose zu verstehen. Es ist ätiologisch und pathophysiologisch mit der akuten Dekompensation dieser verknüpft, weshalb hier zuerst die Leberzirrhose als solches betrachtet wird.

3.1.1 Definition

Bereits im Jahr 1819 verwandte der französische Arzt und Erfinder des Stethoskops René Laennec in seinem Werk „De l'auscultation médiate“ den Begriff Zirrhose. Er betrachtete noduläre gelb-bräunliche Veränderungen in Lebern von Erkrankten und beschrieb diese aufgrund ihrer Farbe, abgeleitet vom griechischen Wort *kirrhos* (gelbbraun), als Zirrhose [22,38,42]. Die Leberzirrhose stellt das irreversible Endstadium der chronischen Lebererkrankungen dar. Sie wird durch chronische Fibrose induziert und histopathologisch über die Zerstörung der physiologischen Leberarchitektur definiert. Die Zerstörung der Leberarchitektur wird durch diffuse Bindegewebsproliferation, Nekrose und die nachfolgende Ausbildung von regenerativen nodulären Strukturen vorangetrieben [7,13].

3.1.2 Epidemiologie

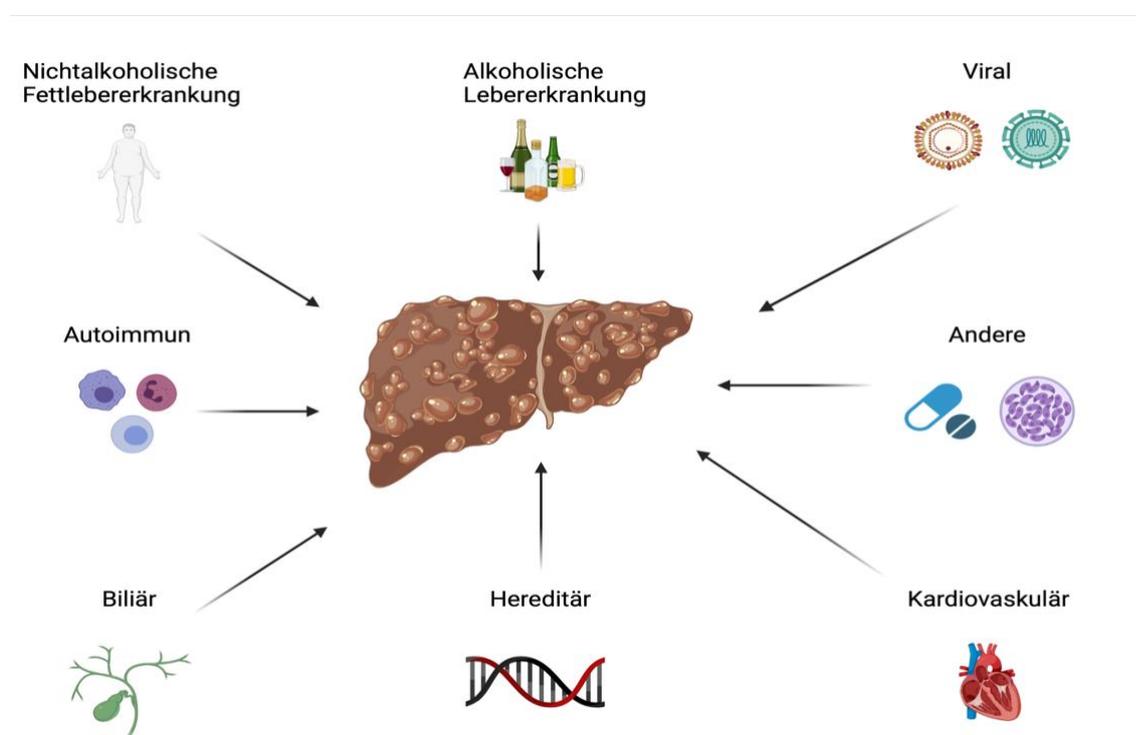
Die genaue Prävalenz der Leberzirrhose ist schwer zu erfassen und es ist von einer hohen Dunkelziffer auszugehen [13,37]. Jedoch ist klar, dass sie mit mehr als einer Millionen Todesfällen weltweit im Jahr 2010 eine der größten gesundheitlichen Herausforderungen unserer Zeit ist [98]. In Europa wird von 170 000 durch Leberzirrhose verursachten Todesfällen pro Jahr ausgegangen. Innerhalb Europas unterliegt die Mortalitätsrate für Leberzirrhose erheblichen geographischen Schwankungen, mit besonders hohen Werten für einige Länder im Süd- und Nord-Osten Europas. Dieser Umstand ist womöglich auf die unterschiedliche Verteilung des Risikofaktors Alkoholkonsum zurückzuführen [16,134]. Es gibt nur wenige Daten über die genaue Prävalenz der Leberzirrhose. Schätzungen gehen davon aus, dass bis zu ein Prozent der Weltbevölkerung histologische Zeichen einer Leberzirrhose aufweisen [37]. In einer Studie von Fleming *et al.* wurde für das Vereinigten Königreich eine Prävalenz der Leberzirrhose von 76,3 pro 100 000 Personen festgestellt [49]. Im Jahr 2019 wurden in

deutschen Krankenhäusern 23 737 vollstationäre Patienten mit der ICD-10 Diagnose „K74 Fibrose und Zirrhose der Leber“ diagnostiziert [140]

3.1.3 Ätiologie

Die Leberzirrhose kann durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen werden, wobei die Majorität der Leberzirrhosen nutritiv-toxisch oder viral bedingt ist [13]. Ein exemplarischer Überblick über die Ursachen ist in Abbildung 1 zu finden.

Abbildung 1: Exemplarischer Überblick der Ursachen der Leberzirrhose



In Deutschland ist die alkoholische Lebererkrankung durch chronischen Alkoholabusus die häufigste Ursache der Leberzirrhose. Nachfolgend spielen die chronischen Virushepatitiden B/C und die nichtalkoholische Fettlebererkrankung eine große Rolle [13,129]. Allein im Jahr 2009 starben 8 619 Menschen in Deutschland an einer alkoholbedingten Leberzirrhose [129]. In einigen Fällen kann keine Ursache für die Leberzirrhose identifiziert werden, man spricht dann von einer kryptogenen Leberzirrhose [13]. Nach aktuellem Stand der Wissenschaft wird angenommen, dass einem Großteil der kryptogenen Leberzirrhosen die nichtalkoholische Fettlebererkrankung zugrunde liegt [26,27].

3.1.4 Pathophysiologie

Durch eine langanhaltende Leberschädigung, die mit einer Entzündungsreaktion und Fibrosierung der Leber einhergeht, entsteht letztendlich die Leberzirrhose [37,124]. Die leberschädigende Noxe zerstört Hepatozyten, woraufhin die Leber mit der Ausbildung von kollagenhaltigen Narben antwortet; der sogenannten Fibrose [37]. Auf Zellebene kommt es durch die Entzündungsreaktion zur Aktivierung der hepatischen Sternzellen (auch Ito-Zellen genannt). Die inaktivierte hepatische Sternzelle ist für die Speicherung von Vitamin-A-Derivaten zuständig. In ihrer aktivierten Form produziert sie große Mengen extrazellulärer Matrix, welche sich im Wesentlichen aus Glykoproteinen, Kollagen und Proteoglykanen zusammensetzt [125]. In der Konsequenz zerstört diese exzessive Produktion und Ablagerung der extrazellulären Matrix - die Quantität der extrazellulären Matrix erhöht sich um das bis zu Fünffache - die physiologische Architektur der Leber und führt darüber hinaus zu einer gestörten Leberfunktion [52,125]. Die wesentlichen klinischen Folgen der Leberzirrhose sind die Leberinsuffizienz, die portale Hypertension und das Hepatozelluläre Karzinom [37]. Für das Verständnis der Pathophysiologie des ACLF ist vor allem die portale Hypertension wichtig, weshalb diese im Folgenden kurz erläutert wird. Die portale Hypertension ist die Folge des erhöhten intrahepatischen Gefäßwiderstandes, welcher auf die strukturelle und funktionelle Veränderung der hepatischen Gefäße zurückzuführen ist [124]. Zu den strukturellen Veränderungen zählen die Ablagerung von Narbengewebe im Disse-Raum und die Kapillarisation der Lebersinusoide bei Leberzirrhose [11,37,124,132]. Es wird davon ausgegangen, dass 70% - 80% der Einschränkung des portalen Blutflusses auf diese strukturellen Veränderungen zurückzuführen sind. Die übrigen 20% - 30% Einschränkung werden durch Vasokonstriktion der hepatischen Gefäße verursacht [68,95,124]. Neben Ungleichgewichten zwischen vasodilatativen und vasokonstriktiven Gewebshormonen in zirrhotischen Lebern, spielen hier die hepatischen Sternzellen eine entscheidende Rolle. In ihrem aktivierten Zustand nehmen sie einen myofibroblastenähnlichen Phänotyp ein und kontrahieren sich um die hepatischen Gefäße, wodurch diese verengt werden [68,95,124]. Als Folge der portalen Hypertension bilden sich Kollateralkreisläufe zwischen dem Pfortaderkreislauf und dem systemischen Kreislauf, zusätzlich kommt es sowohl zu einer, durch Stickstoffmonoxid (NO) gesteuerten, Dilatation der arteriellen Gefäße des viszeralen Stromgebiets (Splanchnikusgebiet), als auch des systemischen Kreislaufs [68,69]. Auf systemischer Ebene führt die arterielle Dilatation zu einer hyperdynamischen Kreislaufsituation, während sie auf portaler Ebene zu einer Verschlechterung der portalen Hypertension beiträgt [19].

3.2 Akut-auf-chronisches Leberversagen (ACLF)

3.2.1 Definition

Das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF) ist eine neue Krankheitsentität, welche erst kürzlich als eigenständiges Krankheitsbild von der akuten Dekompensation einer Leberzirrhose abgegrenzt wurde [99]. Seitdem der englischsprachige Begriff „acute-on-chronic liver failure (ACLF)“ das erste Mal im Jahr 1995 in der Literatur verwendet wurde, gab es mindestens dreizehn verschiedene Definitionen für dieses Krankheitsbild [130]. Bis heute ist das akut-auf-chronische Leberversagen uneinheitlich definiert, wobei die beiden meistverwendeten Definitionen von der Asia-Pacific Association for the Study of Liver (APASL) aus dem Jahr 2009 und von der European Association for the Study of Liver-Chronic Liver Failure Consortium (EASL-CLIF) aus dem Jahr 2013 stammen. Beide Definitionen beschreiben das akut-auf-chronische Leberversagen als ein Zusammenspiel von einer chronischen Schädigung der Leber (i.d.R. Leberzirrhose) auf die dann ein akutes, direkt oder indirekt leberschädigendes, Ereignis trifft, welches als Auslöser verstanden wird [117]. Die beiden Definitionen unterscheiden sich unter anderem in der Definition der chronischen Leberschädigung. So schließt die Definition der EASL nur Patienten mit Leberzirrhose ein, wohingegen die Definition der AAPSL Patienten mit chronischen Lebererkrankungen im Allgemeinen einschließt. Ebenso unterscheiden sie sich in der Definition des auslösenden Ereignisses, bei der Definition der EASL kann dieses hepatisch oder extrahepatisch sein, während bei der Definition der AAPSL nur direkt hepatische Auslöser gewertet werden [114]. In dieser Arbeit wird das akut-auf-chronische Leberversagen nach den Kriterien der EASL-CLIF definiert.

Nach dieser Definition handelt es sich beim akut-auf-chronischen Leberversagen um ein Krankheitsbild bei Patienten mit Leberzirrhose, welches folgende Kriterien einschließt:

- Akute Dekompensation der Leberzirrhose, ausgelöst durch ein direkt oder indirekt leberschädigendes Ereignis.
- Ein- oder Mehrorganversagen.
- Eine 28-Tage Mortalität von über 15%.

Die akute Dekompensation der Leberzirrhose wird hierbei definiert als das Auftreten von Aszites, einer hepatischen Enzephalopathie, einer gastrointestinalen Blutung, einer bakteriellen Infektion oder einer Kombination aus diesen [99]. Das Organversagen wird über den für Leberzirrhose modifizierten CLIF-SOFA Score definiert. Ab welcher Punktzahl von Versagen des jeweiligen Organsystem gesprochen wird, ist in Tabelle 1 fett gedruckt: Leber ≥ 4 , Niere ≥ 2 , Gehirn ≥ 3 , Gerinnung ≥ 4 , Kreislauf ≥ 2 , Atmung = $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oder $\text{SpO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ [99].

Tabelle 1: CLIF-SOFA Score der Europäischen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber

Punkte/ Organsystem	0	1	2	3	4
Leber (Bilirubin, mg/dl)	< 1,2	≥ 1,2 - < 2,0	≥ 2,0 - < 6,0	≥ 6,0 - < 12,0	≥ 12,0
Niere (Kreatin, mg/dl)	< 1,2	≥ 1,2 - 2,0	≥ 2,0 < 3,5 / Nierenersatz- verfahren	≥ 3,5 - < 5,0 / Nierenersatz- verfahren	≥ 5,0 / Nierenersatz- verfahren
Gehirn (HE Grad)	Keine HE	I	II	III	IV
Gerinnung (INR)	< 1,1	≥ 1,1 - 1,25	≥ 1,25 - 1,5	≥ 1,5 - > 2,5	≥ 2,5 oder Thrombozyten ≤ 20 000/ μl
Kreislauf (MAD in mmhg) Medikamente (μg/Kg pro Minute)	≥ 70	< 70	Dopamin ≤ 5 / Dobutamin oder Terlipressin (Dosisun- abhängig)	Dopamin ≥ 5 Adrenalin ≤ 0,1 Noradrenalin ≤ 0,1	Dopamin ≥ 15 Adrenalin > 0,1 Noradrenalin > 0,1
Atmung I (PaO ₂ /FiO ₂)	> 400	> 300 - ≤ 400	> 200 - ≤ 300	> 100 - ≤ 200	≤ 100
Atmung II (SpO ₂ /FiO ₂)	> 512	> 357 - ≤ 512	> 214 - ≤ 357	> 89 - ≤ 214	≤ 89

Nach der oben genannten Definition des EASL-CLIF und dem CLIF-SOFA Score (Tabelle 1) werden verschiedenen ACLF-Grade unterschieden (Tabelle 2) [65,99].

Tabelle 2: Einteilung des ACLF in unterschiedliche Schweregrade

Kein ACLF	ACLF-Grad 1	ACLF-Grad 2	ACLF-Grad 3
Kein Organversagen	Nierenversagen	Versagen von zwei Organsystemen	Versagen von drei oder mehr Organsystemen
Organversagen (ohne Niere) bei Serumkreatinin < 1,5 mg/dl und ohne HE	Versagen von Leber, Gerinnung, Kreislauf oder Atmung, bei Serumkreatinin von 1,5 - 1,9 mg/dl und/oder mild bis mittelgradige HE		
Reine HE bei Serumkreatinin < 1,5 mg/dl	Reine HE bei Serumkreatinin von 1,5 - 1,9 mg/dl		

Grundsätzlich hat nach der EASL-CLIF Definition jeder Patient mit Leberzirrhose das Risiko ein ACLF zu entwickeln. Somit beschränkt sich die Risikopopulation auf alle Patienten mit Leberzirrhose, deren Prävalenz weiter oben beschrieben wurde. In der CANONIC-Studie hatten von den Patienten, die mit dekompenzierter Leberzirrhose in ein Krankenhaus aufgenommen wurden, jeweils 11% ein ACLF vom Grad 1, 1,8% ein ACLF vom Grad 2 und 3,5% ein ACLF vom Grad 3 [99]. Die entsprechenden Mortalitätsdaten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Mortalität des ACLF

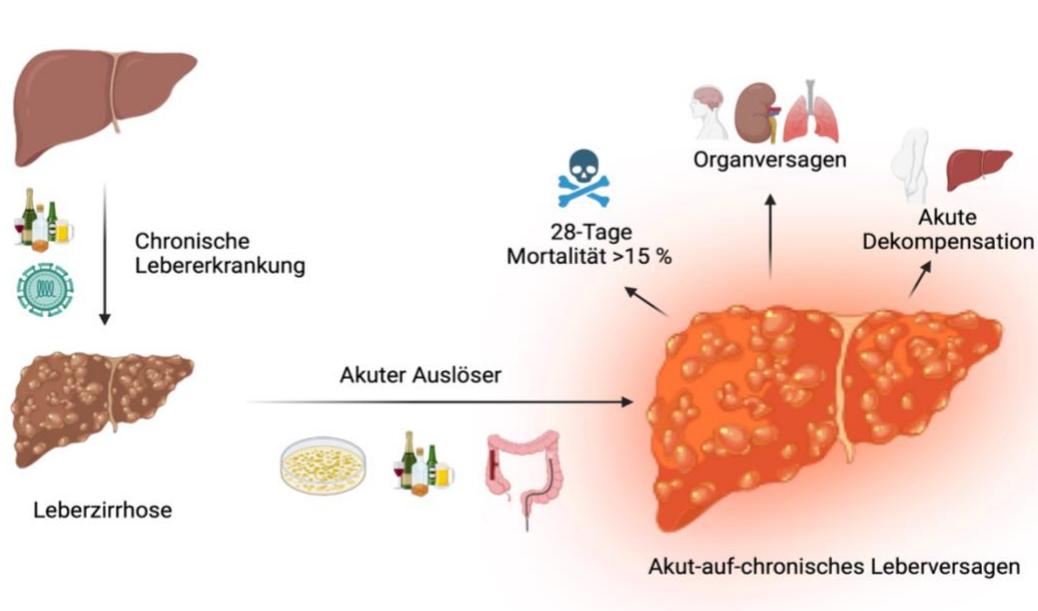
	28 Tage-Mortalität	90 Tage-Mortalität
ACLF Grad 1	22,1%	40,7%
ACLF Grad 2	32,0%	52,3%
ACLF Grad 3	76,7%	79,1%

Aktuelle Daten aus dem Jahr 2021 beschreiben noch höhere Prävalenzen für das ACLF. Hierbei liegt die weltweite Prävalenz von ACLF unter Patienten, die mit dekompensierter Leberzirrhose ins Krankenhaus aufgenommen wurden, bei 35% (95% KI: 33% - 38%) und die 90-Tage Mortalität bei 58% (95% KI: 51% - 64%) [96].

3.2.2 Ätiologie

Beim akut-auf-chronischen-Leberversagen handelt es sich um die akute Verschlechterung der Funktion einer chronisch geschädigten Leber [71]. Wie bereits die beiden Schlüsselwörter „akut“ und „chronisch“ im Namen des Krankheitsbildes beschreiben, sind an der Entwicklung desselbigen zwei Komponenten, davon eine chronisch und die andere akut, beteiligt (Abbildung 2) [60,99].

Abbildung 2: Ätiologie des akut-auf-chronischen Leberversagens



Damit ein Patient an einem ACLF nach EASL-CLIF Definition erkranken kann, muss er bereits an einer Leberzirrhose vorerkrankt sein [60,99]. Die häufigsten Ursachen für die Leberzirrhose beim ACLF sind identisch mit den oben beschriebenen Ursachen für Leberzirrhose im Allgemeinen und sind in absteigender Reihenfolge:

- Alkoholabusus
- Nichtalkoholische Steatohepatitis
- Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus
- Alkoholabusus und eine Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus

Diese Daten beziehen sich, wegen der EASL-CLIF Definition, auf europäische Patientenkollektive [99,122]. Weltweit ist die Gewichtung der Ursachen unterschiedlich [1].

Nach gängiger Ansicht trifft auf die chronisch geschädigte Leber dann noch ein akut leberschädigendes Ereignis, woraufhin es zur Dekompensation der Leberzirrhose und zur Entwicklung des akut-auf-chronischen-Leberversagens kommt. Dieses akut leberschädigende Ereignis, sollte in engem zeitlichen Zusammenhang mit dem Beginn des ACLF stehen und wird auch als auslösendes Ereignis bezeichnet [99,123]. Die häufigsten auslösenden Ereignisse sind, in absteigender Reihenfolge [123]:

- Bakterielle Infektion
- Schwere alkoholische Hepatitis durch massiven Alkoholkonsum
- Gastrointestinale Blutungen mit hypovolämischem Schock
- Medikamenten-induzierte toxische Enzephalopathie

Zu den häufigsten bakteriellen Infektionen beim ACLF zählen Harnwegsinfektionen, Pneumonien, Hautinfektionen, Bakteriämie und die spontan bakterielle Peritonitis [65,99,123]. Die auslösenden Ereignisse können einzeln oder in Kombination auftreten. Je nach Studie, konnte in 29% - 44% der Fälle jedoch kein auslösendes Ereignis identifiziert werden [99,123].

3.2.3 Pathophysiologie

3.2.3.1 Einordnung

Nach gängiger Ansicht wird die Pathophysiologie des ACLF maßgeblich von zwei Phänomenen bestimmt: hämodynamische Veränderungen im Kreislaufsystem und eine Dysfunktionen des Immunsystem [15,65]. Als Vorüberlegung ist es wichtig zu verstehen, dass, nach gegenwärtigem Stand der Forschung, die Pathophysiologie des ACLF nicht isoliert betrachtet werden kann. Vielmehr muss sie in Zusammenschau mit der pathophysiologischen Ausgangssituation bei Patienten mit Leberzirrhose und der akuten Dekompensation dieser

betrachtet werden, denn bereits im Stadium der Leberzirrhose liegen erhebliche immunologische und hämodynamische Pathologien vor, aus deren Verschlechterung sich letztendlich das ACLF entwickelt [5,15,91].

3.2.3.2 Immunologische Grundlagen

Um die komplexen immunologischen Vorgänge beim ACLF präzise beschreiben zu können, müssen vorher einige immunologische Grundlagen erläutert werden. Pathogene, zu denen auch Bakterien gehören, exprimieren evolutionsgeschichtlich konservierte Muster, die „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) [4,15,97]. Diese PAMPs sind deshalb evolutionsgeschichtlich konserviert, weil sie für das Überleben des Pathogenes wichtig sind, somit unterscheiden sie sich auch zwischen vielen verschiedenen Pathogenen nicht [4,97]. Diesen Umstand macht sich unser angeborenes Immunsystem zunutze, indem es die PAMPs über spezielle Rezeptoren - die „pattern recognition receptors“ (PRRs) - erkennt, woraufhin diese eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems einleiten und eine Verbindung zum erworbenen Immunsystem herstellen [4,97]. Die bekannteste und am besten untersuchte Familie der PRRs sind die „Toll-like receptors“ (TLRs) [97]. TLRs lösen ihre Immunantwort über Signalkaskaden aus, an deren Ende die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B steht, welcher seinerseits die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-1, IL-6 und TNF- α) kontrolliert [79,97]. Im menschlichen Körper sind 10 verschiedene TLRs bekannt, die sowohl auf Zellen des Immunsystems als auch auf normalen Körperzellen exprimiert werden und verschiedene PAMPs erkennen können [4,80]. So ist TLR-4 beispielsweise auf der Zelloberfläche lokalisiert und erkennt unter anderem Lipopolysaccharide als PAMPs, weshalb er eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von bakteriellen Infektionen spielt [4]. Ebenso können TLRs auch bestimmte körpereigenen Moleküle, welche als „damage associated molecular patterns“ (DAMPs) bezeichnet werden, erkennen und daraufhin eine Immunantwort auslösen [15,80] Beispiele für DAMPs sind intrazelluläre Moleküle, die von nekrotischen Zellen in den Extrazellulärraum gelangen, oder Bestandteile der extrazellulären Matrix, welche nach Gewebsverletzungen freigesetzt werden [15,105]. Das Zusammenspiel von DAMPs und TLRs ist, sowohl bei Infektionen als auch bei steriler Gewebeschädigung, ein wichtiger Baustein in der Immunantwort des angeborenen Immunsystems [105]. Gleichwohl gibt es Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus zu systemischer Entzündung führt, sowie an der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Krankheiten beteiligt ist [105,111].

3.2.3.3 Zirrhose-assoziierte Immundysfunktion

Die Leberzirrhose führt zu Veränderungen im menschlichen Immunsystem, welche im Verlauf auch die Pathogenese des ACLF maßgeblich beeinflussen [91]. Um diese Veränderung treffend zu beschreiben, wurde das Konzept der „cirrhosis-associated immun dysfunction“ (CAID) eingeführt [5]. Nach diesem Konzept führt die Leberzirrhose zu zwei gegensätzlichen pathologischen Zuständen des Immunsystems: Systemische Entzündung und Immundefizienz [5]. Das Auftreten der systemischen Entzündung bei Leberzirrhose wurde in zahlreichen Patientenstudien über den Nachweis von erhöhten Entzündungsmarkern im Serum nachgewiesen; beispielsweise wurden bei Patienten mit Leberzirrhose erhöhte Serumwerte für TNF- α , IL-6 und IL-1 β gemessen [5,120]. Darüber hinaus konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass erhöhte Entzündungsmarker im Serum mit einer erhöhten Sterblichkeit bei akuter Dekompensation der Leberzirrhose assoziiert sind [121]. Die systemische Entzündung bei Leberzirrhose entsteht durch die Translokation von Bakterien oder ihren Bestandteilen aus dem Darmlumen in das Körperinnere [5,10]. Die PAMPs der Bakterien werden von PRRs auf Immunzellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes, der Mesenteriallymphknoten oder des peripheren Blutes erkannt und es wird eine proinflammatorische Immunantwort ausgelöst [5,91,102]. Zusätzlich wird angenommen, dass bei Leberzirrhose auch DAMPs aus geschädigten Hepatozyten freigesetzt werden, welche ebenso wie die PAMPs, über PRRs erkannt werden. In der Folge lösen auch die DAMPs eine proinflammatorische Immunantwort aus und führen zu einer sterilen Entzündung [5,84,91]. Die Leberzirrhose führt bei den Patienten, über pathologische Veränderungen im angeborenen und erworbenen Immunsystem, zu einer Immundefizienz, wodurch diese ein erhöhtes Risiko für bakterielle Infektionen aufweisen [5,72]. Als Ausdruck dessen wurden unter mit dekompensierter Leberzirrhose hospitalisierten Patienten bakterielle Infektionsraten von 25% - 32% erfasst [46,47]. Im Normalzustand ist die Leber ein wichtiger Bestandteil der Immunüberwachung des menschlichen Körpers. Sie ist das erste Organ, welches mit mikrobiellen Noxen, welche über den Darm aufgenommen wurden, in Kontakt kommt [67]. Das retikulohistiozytäre System der Leber - bestehend unter anderem aus Kupfer-Zellen (Makrophagen) und lebersinusoidalen Endothelzellen - ist, durch die strukturellen Veränderungen bei Leberzirrhose, in seiner Funktion gestört und kann bakterielle Pathogene nicht mehr vollumfänglich aus dem Blut entfernen [5,73]. Diese Aussage stützend, erkrankten Patienten mit Leberzirrhose und kompromittiertem retikulohistiozytärem System häufiger an bakteriellen Infektionen als Patienten mit Leberzirrhose, deren retikulohistiozytäres System intakt war [109]. Zusätzlich zur Beeinträchtigung der hepatischen Immunüberwachung führt

die Leberzirrhose auch zur verminderten Synthese wichtiger Bausteine der systemischen Immunabwehr [5,67]. Bei Patienten mit Leberzirrhose wurden verminderte Spiegel von Komplementfaktor C3 und eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen festgestellt [63]. Darüber hinaus unterliegen bei Leberzirrhose auch die B- und T-Lymphozyten qualitativen und quantitativen Veränderungen [5], beispielsweise führt die Leberzirrhose, unabhängig ihrer Ätiologie, zu einem Verlust von CD-27⁺ Gedächtniszellen [41].

3.2.3.4 Immundysfunktion bei ACLF

Die Pathophysiologie des ACLF ist bis heute unvollständig verstanden und Gegenstand intensiver Forschung. Die Hauptursache scheint jedoch die Exazerbation der, bereits bei Leberzirrhose vorhandenen, systemischen Entzündung zu sein. Die Exazerbation der systemischen Entzündung führt über die exzessive Produktion proinflammatorischer Zytokine (Zytokinsturm) zu einem Sepsis-ähnlichen Zustand mit (Multi-) Organversagen [15,32,91]. Schon in der CANONIC-Studie wurde festgestellt, dass bei Patienten mit ACLF die Entzündungsreaktion des Immunsystems (gemessen über CRP und Leukozytenzahl) stärker ausgeprägt ist als bei Patienten mit akut dekompenzierter Leberzirrhose ohne ACLF. Darüber hinaus korreliert die Stärke der Entzündungsreaktion positiv mit dem Schweregrad des ACLF [99]. Aufgrund dieser und ähnlicher Beobachtungen, welche die Fehlregulation des Immunsystems als entscheidenden Faktor bei der Dekompensation der Leberzirrhose und des ACLF hervorheben, wurde die „Systemic Inflammation Hypothesis“ (SIH) formuliert [15]. Nach dieser Theorie ist das ACLF die Folge einer fortschreitenden systemischen Inflammation, welche durch die unter 3.2.3.2 und 3.2.3.3 beschriebenen Aktivierungsmechanismen des angeborenen Immunsystems bei Leberzirrhose über PAMPs und DAMPs verursacht wird [15]. Die systemische Inflammation würde im Verlauf zu zwei Effekten führen, welche den schweren Verlauf des ACLF begründen:

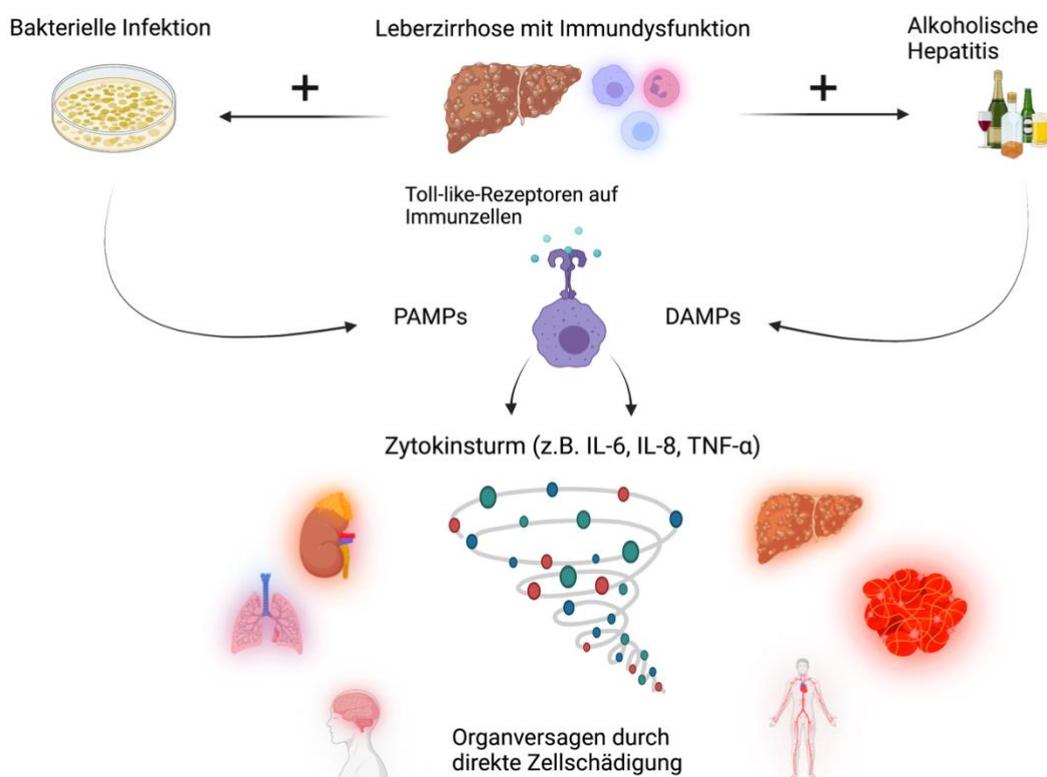
- Sie verursacht die, bereits bei Leberzirrhose vorhandene und NO-gesteuerte Dilatation der arteriellen Gefäße des Splanchnikusgebiets, wodurch es zur Minderperfusion verschiedener Organsysteme kommt.
- Sie führt zur massiven Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Zytokinsturm) und reaktiver Sauerstoffspezies, welche in den betroffenen Organen direkt zu Zellschaden und -tod führen.

Nach der SIH ist das für die Diagnose und Prognose des ACLF entscheidende (Multi-) Organversagen, die Konsequenz sowohl von Minderdurchblutung als auch direkter Zellschädigung der betroffenen Organsysteme durch proinflammatorische Zytokine. Wobei die

dafür verantwortliche systemische Inflammation bereits bei der Leberzirrhose vorhanden ist. Im Falle des ACLF kommt es dann durch das auslösende Ereignis (PAMPs bei bakterieller Infektion oder DAMPs aus Hepatozyten bei alkoholischer Hepatitis) zu einer massiven Exazerbation der systemischen Inflammation [15,33]. Der Mechanismus der direkten Zellschädigung durch den Zytokinsturm mit konsekutivem Organversagen wurde bereits bei der Sepsis, einem Krankheitsbild mit vielen Parallelen zum ACLF, beschrieben. Hier kommt es unter anderem durch Beeinträchtigung der Mikrozirkulation zu Hypoxämie und Organschädigung [32,35]. Im Allgemeinen ist es so, dass jede Reaktion des Immunsystems auch mit Kosten für den menschlichen Organismus in Form von Kollateralschäden verbunden ist. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von „Immunopathology“, als Konsequenz der überschießenden Immunreaktion. Wobei hier gilt: Je stärker die Immunreaktion, desto ausgeprägter scheinen die Kollateralschäden zu sein [70]. Eben dieses Konzept scheint auch für die Pathophysiologie des ACLF von Bedeutung zu sein, insbesondere weil die Fähigkeit des Organismus Infektionen und die daraus folgenden Immunreaktionen zu tolerieren, durch die vorbestehende Leberzirrhose, verschlechtert zu sein scheint [91]. Die SIH als Erklärungsansatz der Pathophysiologie des ACLF wurde bereits in Patientenstudien überprüft und teilweise bestätigt [33]. Hierbei wurde festgestellt, dass schon Patienten mit dekompenzierter Leberzirrhose ohne ACLF, im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen, erhöhte Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-6, IL-8 und TNF- α) und Marker für oxidativen Stress (Human Nonmercaptalbumin 2 [HNA2]) aufweisen. Bei Patienten mit ACLF waren die Serumspiegel dieser proinflammatorischen Zytokine und Marker für oxidativen Stress nochmals deutlich stärker erhöht [33]. Somit ist davon auszugehen, dass die systemische Entzündung vom gesunden Normalzustand über die Leberzirrhose bis hin zum ACLF progressiv zunimmt. Darüber hinaus korrelierten die Serumspiegel von IL-6, IL-8 und HNA2 positiv mit dem Schweregrad (Grad I, II oder III) und der 28-Tages/90-Tages Mortalität des ACLF [33]. Ähnliches wurde auch für den Krankheitsverlauf des ACLF beobachtet: Verbesserungen des Schweregrads im Verlauf des Krankenhausaufenthalts waren mit einer Abnahme der Serumspiegel von IL-6, IL-8 und HNA2 assoziiert, wohingegen Verschlechterungen des Schweregrads mit einem Anstieg der selbigen assoziiert waren [33]. In derselben Studie wurde kein Zusammenhang zwischen der Dysfunktion des Kreislaufsystems (gemessen über die Plasmareninkonzentration) und dem Schweregrad oder der Dynamik des ACLF festgestellt. Folglich ist davon auszugehen, dass die systemische Entzündung der Haupttreiber des ACLF ist und das Organversagen hauptsächlich durch direkt zellschädigende Effekte des Zytokinsturms hervorgerufen wird [33]. Zudem fiel auf, dass die Zytokine, deren

Serumspiegel bei Patienten mit ACLF signifikant höher waren als bei Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose, alle im Arm des angeborenen Immunsystem vergesellschaftet waren [33]. Diese Beobachtung passt zu dem eingangs beschriebenen Konzept, wonach durch das Zusammenspiel von DAMPs, PAMPs und TLRs eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems ausgelöst wird. Wie bekannt hat das ACLF im Unterschied zur akuten Dekompensation der Leberzirrhose einen schwereren Verlauf und wird häufig durch auslösende Ereignisse verursacht [99]. In Bezug auf die SIH könnten diese auslösenden Ereignisse (z.B. bakterielle Infektion oder alkoholische Hepatitis) mittels der jeweils freigesetzten PAMPs (bakterielle Infektion) oder DAMPs (alkoholische Hepatitis) den beobachteten Zytokinsturm, über eine Immunantwort des angeborenen Immunsystems, hervorrufen und somit den schweren Verlauf des ACLF mit (Multi-) Organversagen begründen (Abbildung 3).

Abbildung 3: Pathophysiologie des akut-auf-chronischen Leberversagens



Interessanterweise wurden, im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen, bei Patienten mit ACLF und bei Patienten mit akut dekompensierter Leberzirrhose erhöhte Serumspiegel sowohl des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 als auch des antiinflammatorisch wirkenden IL-1 Rezeptor-Antagonisten gemessen. Die Erhöhungen der Serumspiegel dieser

antiinflammatorischen Zytokine fiel jedoch geringer aus als die Erhöhungen der Serumspiegel der proinflammatorischen Zytokine [33]. IL-10 erreicht seine antiinflammatorischen Effekte in dem es unter anderem die Sekretion von TNF- α , IL-1 und IL-6 durch Makrophagen reduziert [61,91]. Folglich könnte die Erhöhung dieser antiinflammatorischen Zytokine als erfolgloser Versuch des Körpers interpretiert werden, wieder eine Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zuständen im Immunsystem herzustellen. Paradoxerweise scheinen Patienten mit ACLF trotz der massiven Aktivierung des angeborenen Immunsystems unter einer verringerten Immunkompetenz zu leiden. Diese Beobachtung wurde bereits in der CANONIC-Studie gemacht, hier war die Rate der bakteriellen Infektion bei Patienten mit ACLF höher als bei Patienten mit akut dekompensierter Leberzirrhose, zudem korrelierte sie positiv mit dem Schweregrad des ACLF [99]. In einer anderen Arbeit wurde bei ACLF-Patienten eine Immunsuppression auf zellulärer Ebene festgestellt [128]. Im Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose wiesen ACLF-Patienten eine geringere Expression von HLA-DR auf Monozyten und eine verringerte *ex-vivo* Produktion von TNF- α nach LPS-Stimulation auf, gleichartige Verringerungen dieser Werte wurden auch bei Patienten mit schwerer Sepsis beobachtet [128]. Bei Patienten mit Sepsis wurde diese Art der zellulären Immunsuppression bereits als wesentlicher Bestandteil der Pathophysiologie identifiziert [20], wobei insbesondere die verringerte HLA-DR-Expression auf Monozyten mit einer erhöhten Mortalität in Verbindung gebracht wurde [87,138]. Abschließend ist zusammenzufassen, dass das Immunsystem bei ACLF auf vielfältige und teils gegensätzliche Weise gestört ist. Es kommt zu einem Zytokinsturm (z.B. IL-6, IL-8 und TNF- α) der zu konsekutivem Organversagen führt, bei gleichzeitigem, erfolglosen Versuch des Organismus dieser systemischen Entzündung über antiinflammatorische Zytokine (IL-10, IL-1ra) entgegenzuwirken. Ebenso liegt auf zellulärer Ebene eine Immunsuppression vor, welche die Patienten susceptibler für bakterielle Infektionen macht.

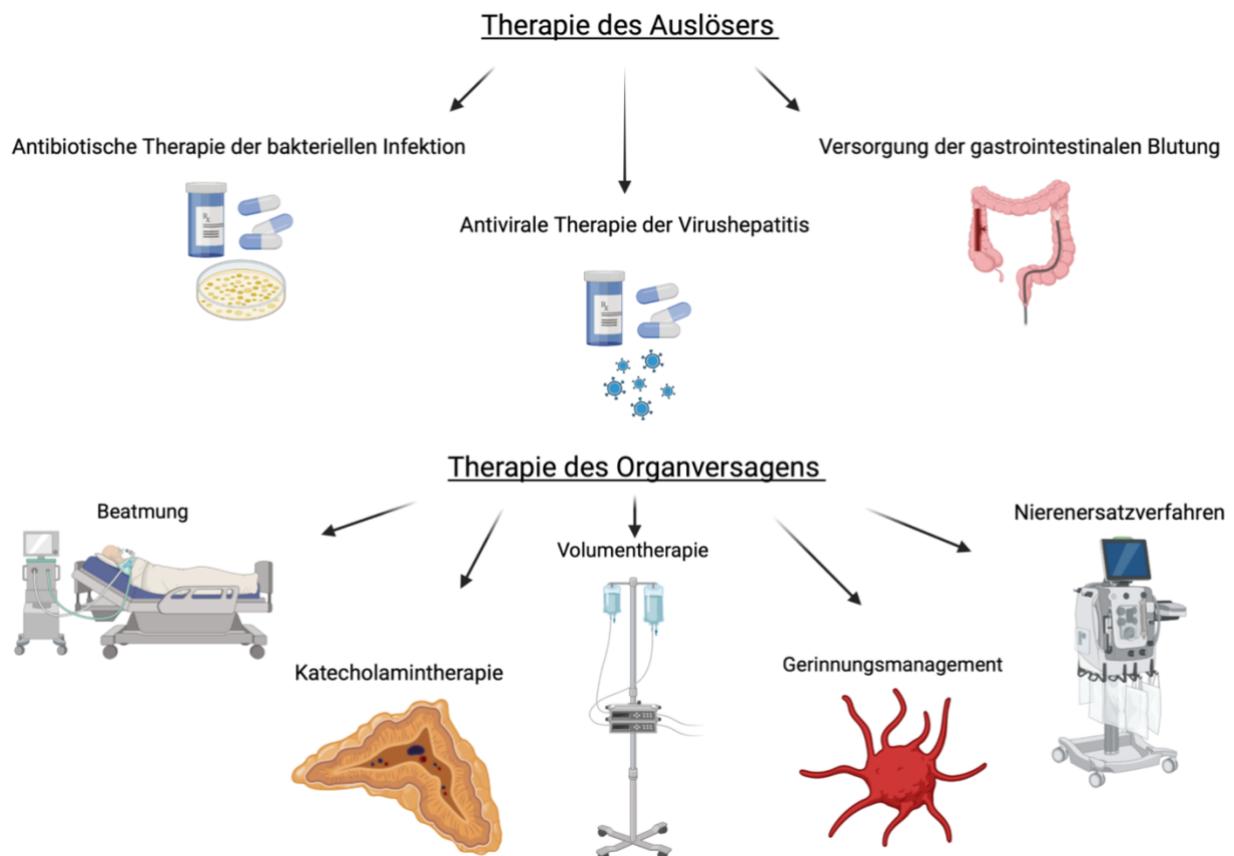
3.2.4 Diagnose

Im klinischem Alltag wird die Diagnose des ACLF bei Patienten mit Leberzirrhose anhand der Kriterien der EASL-CLIF, nach der CANONIC-Studie, gestellt [99]. Zur erleichterten Umsetzung stellt die „European Foundation for the study of chronic liver failure (EF-CLIF)“ den „CLIF-C ACLF Calculator“ zur Verfügung, mit dem ACLF-Grad und erwartete Sterblichkeitsrate berechnet werden können [141].

3.2.5 Therapie

Zurzeit existiert noch keine spezifische Therapie des ACLF, vielmehr stellen das Behandeln der hepatischen Dekompensation sowie des Organversagens die Therapieoptionen der ersten Wahl dar. Ebenso wird versucht das auslösende Ereignis zu identifizieren und zu eliminieren [6,65,76]. Nach aktuellem Stand ist es zur Senkung der Mortalität von entscheidender Bedeutung das ACLF selbst, den Auslöser und die versagenden Organsysteme schnellstmöglich zu erkennen und unmittelbar mit der Therapie zu beginnen [6,65,76]. Wenn beispielsweise eine SBP der Auslöser des ACLF ist, senkt eine zielgerichtete antiinfektive Therapie die 28-Tages und 90-Tages Mortalität und führt insgesamt zu einem milderem Verlauf des ACLF. Wobei es entscheidend ist, dass die antiinfektive Therapie schnellstmöglich beginnt [6,48]. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit eines Biomarkers, mit dem sich das ACLF frühzeitig erkennen und sich die Schwere des Verlaufes abschätzen lässt. In Abbildung 4 sind einige Behandlungsoptionen des ACLF und seiner Komplikationen dargestellt.

Abbildung 4: Therapie des ACLF



3.3 MicroRNAs

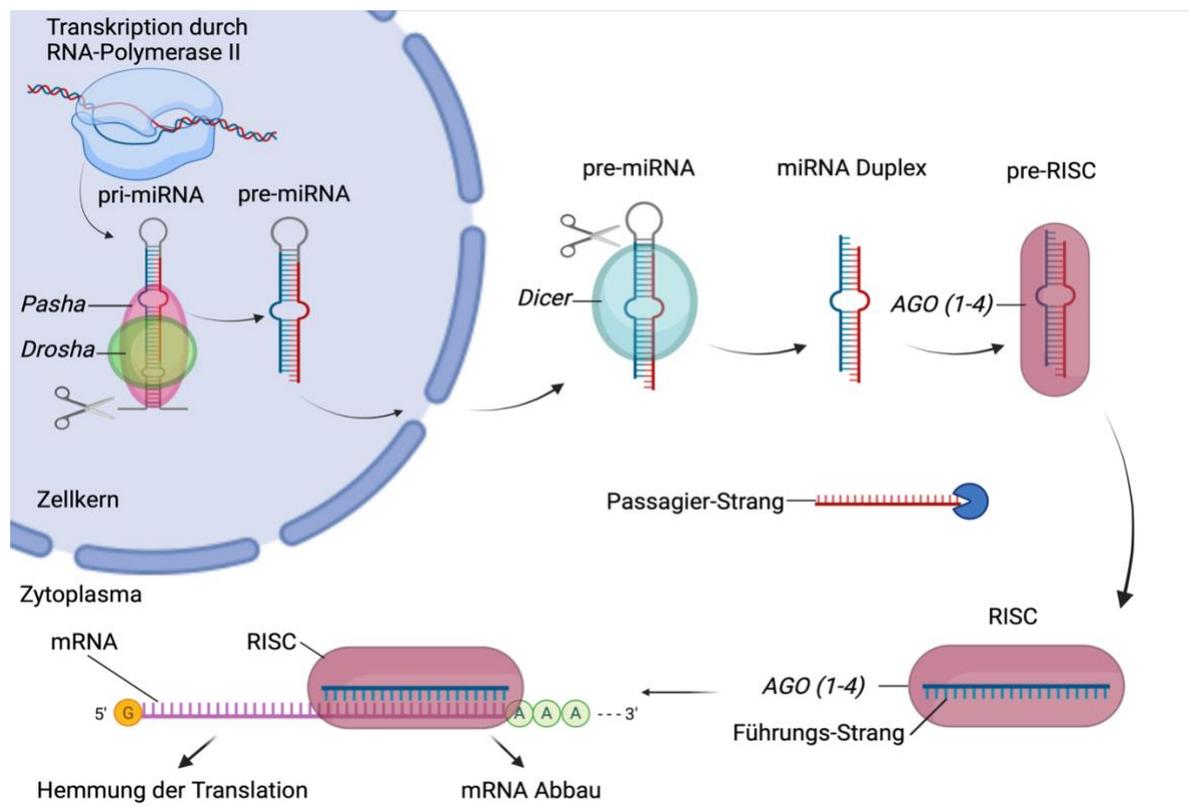
Im Jahr 1993 wurde im Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) ein Gen (*lin-4*) identifiziert, welches für eine kleine, nicht-proteinkodierende RNA kodiert. Die Basensequenz dieser RNA ist komplementär zu der Basensequenz einer mRNA eines damals schon bekannten Proteins (*lin-14*-Protein) desselben Organismus. Es wurde angenommen, dass ebendiese kleine, nicht-proteinkodierende RNA in der Lage ist die Translation der mRNA des *lin-14*-Proteins auf posttranskriptioneller Ebene zu regulieren [86]. Mittlerweile ist *lin-4* als die erste jemals beschriebene microRNA bekannt [104]. Die microRNAs gehören zur Familie der nicht-kodierenden RNAs und bestehen meist aus 22 Nukleotiden. Nicht-kodierend bedeutet, dass microRNAs zwar aus Desoxyribonukleinsäure (DNA) transkribiert werden, anschließend jedoch nicht in ein Protein translatiert werden. Seit ihrer Entdeckung im Jahre 1993 wurden microRNAs intensiv erforscht, so dass heute bekannt ist, dass sie wichtige Steuerelemente der Genexpression sind. Sie steuern die Expression ihrer Zielgene, indem sie an die entsprechenden mRNAs binden und dann zu verringerter Translation oder dem Abbau der mRNAs führen [43,104]. Genetische Untersuchungen ergaben, dass mehr als 60% der proteinkodierende Gene des Menschen Binderegionen für microRNAs aufweisen und somit der Regulation durch microRNAs unterliegen [51].

3.3.1 Biogenese

Der erste Schritt in der Biogenese der microRNAs ist die Transkription ihrer Gene durch die RNA-Polymerase II (Abbildung 5). Die Primärtranskripte werden als pri-microRNAs bezeichnet und weisen eine Haarnadelstruktur auf, welche die reifen microRNA-Sequenzen beinhaltet. Die Prozessierung beginnt mit dem Herauslösen der Haarnadelstruktur aus der pri-microRNA. Dieser Schritt wird von dem sogenannten „Microprocessor Complex“, welcher aus der RNase III *Drosha* und ihrem Cofaktor dem Protein DGCR8 *Pasha* besteht, durchgeführt. Die Haarnadelstruktur wird durch *Drosha* an ihrem basalen Ende von der pri-microRNA abgetrennt und fortan als pre-microRNA bezeichnet. Anschließend wird die pre-microRNA ins Zytoplasma exportiert und dort durch eine weitere Endonuklease vom RNase III-Typ namens *Dicer* prozessiert. *Dicer* trennt die terminale Schleife der Haarnadelstruktur von der pre-microRNA ab, so dass nun ein reifer microRNA Duplex vorliegt. Folglich produziert jeder Genloкус zwei microRNA-Stränge (3'-Ende/5'-Ende) und somit auch zwei reife microRNAs. Die Ausrichtung der microRNA-Stränge ist für die Namensgebung der reifen microRNA bedeutend. Die reife 5p microRNA entspringt dem 5'-Ende des microRNA Duplex, wohin gegen die reife 3p microRNA dem 3'-Ende des microRNA Duplex entstammt. Letztendlich ist

jedoch nur eine der beiden microRNAs (3p/5p) später aktiv und bindet mRNA, der ihr zugehörige Strang des microRNA Duplex wird daher auch als Führungs-Strang bezeichnet. *Vice versa* wird der andere, inaktive Strang als Passagier-Strang bezeichnet und während des Reifungsprozesses abgebaut. Der microRNA Duplex bildet nun zusammen mit einem Argonautenprotein (AGO) den sogenannten „RNA induced silencing complex“ (RISC). Im menschlichen Körper existieren vier verschiedene AGOs (AGO 1 - 4), die alle mit unterschiedlichen microRNA-Duplexen beladen werden können. Nachdem ein AGO-Protein mit einem microRNA-Duplex beladen wurde, bezeichnet man sie als pre-RISC. Um zu einem RISC zu reifen, entwindet der pre-RISC nun den microRNA-Duplex und setzt dabei den Passagier-Strang frei, welcher nach seiner Freisetzung schnell abgebaut wird. Die Unterscheidung zwischen Führungs- und Passagier-Strang wird beim Beladen der AGOs unter Berücksichtigung der thermodynamischen Stabilität der microRNA-Stränge getroffen. Dies führt wie angesprochen dazu, dass im Wesentlichen nur eine der microRNAs wirklich biologisch aktiv ist und deutlich häufiger im microRNA-Pool vorkommt als ihre Isoform. Neben der hier beschriebenen kanonischen microRNA-Biogenese, können reife microRNAs auch über verschiedene nicht-kanonische Wege synthetisiert werden. Die nicht-kanonischen Wege benutzen verschiedene Kombinationen der Proteine und Reaktionsschritte des kanonischen Weges und werden hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt und nicht näher beschrieben [58,104].

Abbildung 5: Biogenese der microRNAs

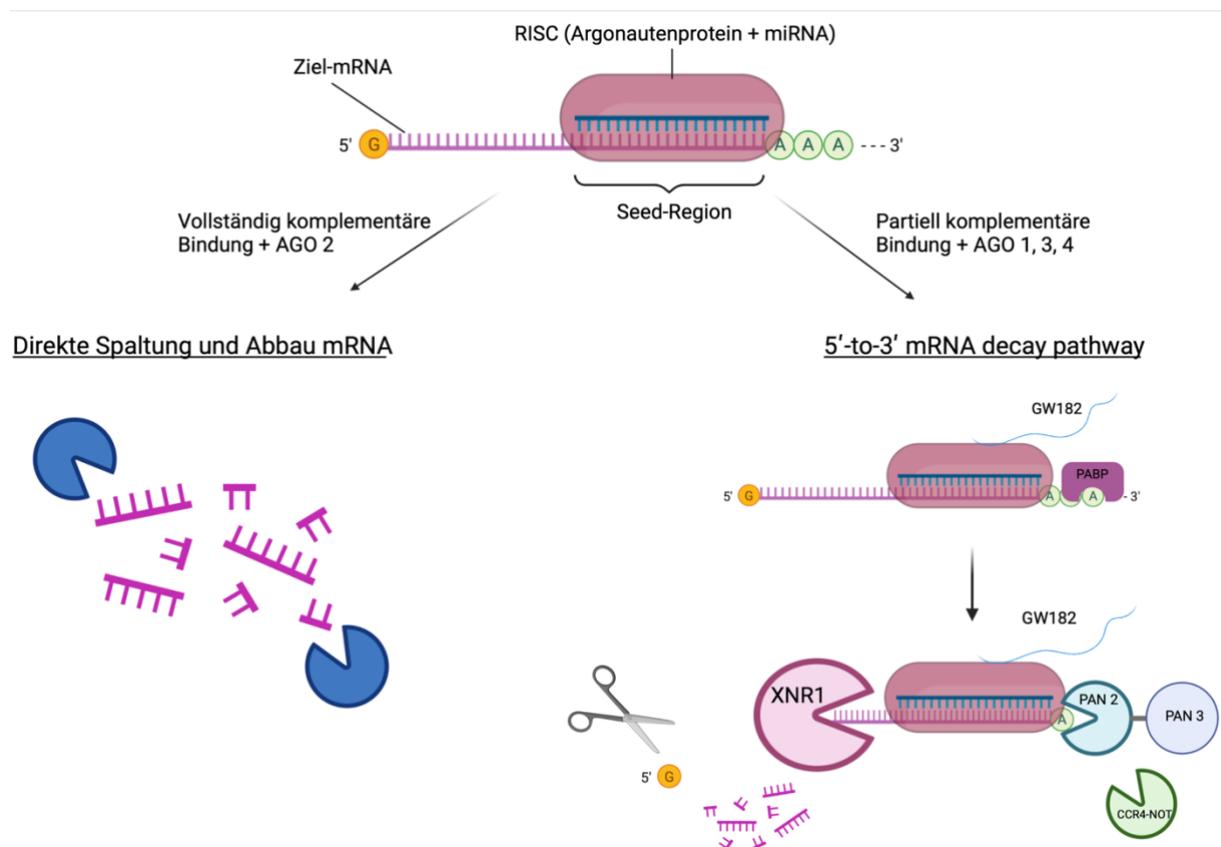


3.3.2 Posttranskriptionelle Genregulation durch microRNAs

Die Grundlage dafür, dass microRNAs ihre spezifischen Ziel-mRNAs erkennen und regulieren können, sind vollständig oder partiell komplementäre Basenpaarungen (Watson-Crick Paarungen) zwischen bestimmten Regionen der Beiden [66]. Jede microRNA weist an ihrem 5'-Ende eine hoch konservierte Region auf, welche auch als „seed“ bezeichnet wird und die Nukleotide 2 - 7 umfasst. Dieser „seed“ ist für die Erkennung und Regulation der Ziel-mRNA entscheidend, mit ihr bindet die microRNA an komplementäre Bindungsstellen in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA [14,66]. In der Regel binden nur die Nukleotide 2 - 7 der „seed“ Region an die Bindungsstellen der mRNA, teilweise ist noch das Nukleotid 8 an der Bindung beteiligt [66]. Neben der klassischen Bindung an die 3'UTR, wurden auch microRNAs beschrieben die an andere Regionen der mRNA, wie zum Beispiel die 5' untranslatierte Region (5'UTR), binden und dort zu unterschiedlichen Effekten auf die Genexpression führen [104,135]. Im Allgemeinen sind der Grad der Komplementarität zwischen microRNA und Ziel-mRNA sowie die Eigenschaften des AGOs entscheidend für die Regulierung der posttranskriptionellen Expression der Ziel-mRNA [74,104]. Ist die Bindung zwischen microRNA und mRNA vollständig komplementär, so sind einige der AGOs (z.B. AGO 2) in der Lage den mRNA-Strang zwischen zwei Nukleotiden zu spalten, woraufhin die

mRNA zügig und effizient abgebaut wird [44,74]. Wenn die Bindung nur partiell komplementär ist oder die vorhandenen AGOs nicht über Endonuklease-Aktivität verfügen (z.B. AGO 1, 3 und 4), wird die Expression der mRNA, über den „5'-to-3' mRNA decay pathway“ durch Deadenylierung gefolgt von mRNA-Abbau, erfolgreich gehemmt [66,74,104]. In diesem Fall rekrutiert der RISC nach partieller Bindung an die Ziel-mRNA ein Protein der GW182-Familie (im Menschen: TNRC6A-C), welches für die Deadenylierung der mRNA unbedingt notwendig ist [66]. Das GW182-Protein bindet daraufhin an das Poly(A)-Bindepotein (PABP), das seinerseits an den Poly(A)-Schwanz der mRNA gebunden ist. Es wird vermutet, dass schon die Interaktion zwischen GW182 und PABP selbst die Translation hemmen kann, indem GW182 die Rolle von PABP bei der Translation stört und PABP die Affinität der mRNA für microRNAs erhöht [66,75]. Nach gegenwärtigem Stand der Wissenschaft ist jedoch vor allem die Interaktion von GW182 mit verschiedenen Deadenylase-Komplexen entscheidend. Als erstes rekrutiert GW182 den Deadenylase-Komplex PAN2-PAN3, wobei PAN2 die katalytische Einheit darstellt und PAN3 für die Bindung an GW182 oder PABP zuständig ist. PAN2-PAN3 beginnt den Poly(A)-Schwanz der mRNA bis zu einem gewissen Punkt abzubauen. Ab diesem Punkt übernimmt der Deadenylase-Komplex CCR4-NOT und baut den Poly(A)-Schwanz nahezu vollständig ab. Anschließend wird die 5'-Cap-Struktur der deadenylierten mRNA von dem Decapping Protein 2 (DCP2) und seinen Kofaktoren abgetrennt. Dieser Prozess wird vermutlich durch CCR4-NOT begünstigt. Nun liegt die mRNA ohne Poly(A)-Schwanz und 5'-Cap-Struktur im Zytoplasma vor. Daraufhin wird sie von ihrem 5'-Ende an durch die 5'-3'- Exoribonuklease 1 (XNR1) abgebaut und die Translation wurde erfolgreich gehemmt [75]. Abbildung 6 liefert einen graphischen Überblick über die geschilderten Prozesse.

Abbildung 6: mRNA-Abbau durch microRNAs



3.3.3 MicroRNAs als Biomarker

Damit sich eine körpereigene Substanz als Biomarker eignet, muss sie folgende Anforderungen erfüllen:

1. Sie sollte leicht zu gewinnen und analysieren sein, so dass der diagnostische Nutzen den Aufwand der Probengewinnung und -verarbeitung überwiegt (z.B. Blutentnahme).
2. Ihr Expressionsmuster sollte bei gesunden Individuen reproduzierbar konstant sein, so dass ein Normbereich definiert werden kann.
3. Veränderungen ihres Expressionsmuster sollten möglichst spezifisch für das zu untersuchende Krankheitsbild sein und idealerweise nicht durch Störeffekte beeinflusst werden.

Bezüglich dieser drei Punkte scheinen microRNAs sehr gute Eigenschaften aufzuweisen, welche in der Literatur häufig beschrieben wurden. In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurden die Expressionsmuster von microRNAs im humanen Serum erstmalig systematisch analysiert. Zuerst wurden die Serumspiegel von 14 microRNAs in sieben gesunden Probanden untersucht und auf ihre Widerstandsfähigkeit getestet. Die Expressionsmuster der microRNAs waren zwischen den einzelnen Individuen sehr ähnlich und wiesen einen Korrelationskoeffizienten

nach Pearson von 0,9-1 auf. Anschließend wurden microRNAs im Serum auf ihre Stabilität getestet. Dabei stellte sich heraus, dass die microRNAs auch noch nach zehn Einfrier-Auftau-Zyklen, nach Inkubation mit saurer (pH-Wert = 1, sowie basischer Lösung (pH-Wert = 13), und nach dem Kontakt sowohl mit RNasen als auch DNasen sicher mit einer qPCR nachweisbar waren [29]. Ebenso wurde in dieser und anderen Studien gezeigt, dass veränderte Expressionsmuster mehrerer microRNAs im Serum spezifisch für gewisse Erkrankungen (z.B. Kolorektales Karzinom, nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom, Diabetes Typ 2 oder Leberzirrhose) sind [17,29,40]. In einer Arbeit aus dem Jahre 2014 untersuchten Forscher einer saarländischen Arbeitsgruppe microRNA-Expressionsmuster in 1 049 Blutproben von Patienten mit 19 verschiedenen Krankheiten zuzüglich einer Kontrollgruppe. Für jede der 19 Krankheiten konnte eine einzigartige Signatur aus verschiedenen microRNA-Expressionsmustern festgestellt werden, die mit keiner anderen Krankheit überlappte. Zudem konnten einige microRNAs identifiziert werden, die bei unterschiedlichen Krankheiten gleichsam exprimiert werden, so dass diese microRNAs mit Krankheit im Allgemeinen assoziiert zu sein scheinen [81]. Bei der Untersuchung von microRNAs als Biomarker soll nicht vergessen werden, dass microRNAs nicht nur, wie andere Biomarker, Neben- oder Abfallprodukte von Stoffwechselprozessen sind, sondern aktiv die Genexpression steuern. Somit ließe sich eventuell auch der Krankheitsprozess durch die Inhibition/Disinhibition entsprechender microRNAs positiv beeinflussen.

3.3.4 MicroRNAs und ACLF

Da es sich beim ACLF um ein hochdynamisches Krankheitsbild handelt, welches insbesondere in der Anfangsphase nur schwer diagnostiziert werden kann, wäre ein zuverlässiger Biomarker hier besonders brauchbar. Gleichwohl gibt es bislang wenige Arbeiten, welche sich mit der Rolle von microRNAs beim ACLF beschäftigt haben. In einer Studie aus dem Jahr 2020 konnte mittels qPCR eine verminderte Expression von *hsa-miR-223-3p* und *hsa-miR-25-3p* bei Patienten mit ACLF (EASL-CLIF Definition) im Vergleich zu Patienten mit dekompensierter Leberzirrhose festgestellt werden. Dabei konnte die verminderte Expression von *hsa-miR-25-3p* als unabhängiger Prognosefaktor für eine erhöhte 30-Tage-Mortalität etabliert werden [31]. Eine weitere Studie aus dem Jahr 2021 hat microRNA-Expressionsmuster während des Krankheitsprogresses vom gesunden Normalzustand über kompensierte und dekompensierte Leberzirrhose bis hin zum ACLF untersucht. Es stellte sich heraus, dass vor allem die Dekompensation zu einer starken Veränderung der microRNA-Expressionsmuster führte, wohingegen das microRNA-Expressionsmuster von Patienten mit ACLF und dekompensierter

Leberzirrhose ähnlich war. Zusätzlich wurde die Dysregulation *hsa-miR-21*, *hsa-miR-26a*, und *hsa-miR-376a* mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen eines ACLF in Verbindung gebracht [17]. Diese Daten zeigen deutlich, dass microRNAs beim Krankheitsprogress der chronischem Lebererkrankungen und dem ACLF beteiligt sind, wobei deren genaue Rolle und ihr diagnostisches oder therapeutisches Potential weiterer Untersuchungen bedürfen.

3.4 Fragestellung

Diese Arbeit soll die Rolle von microRNAs beim akut-auf-chronischen Leberversagen genauer charakterisieren und Einblicke in die intrahepatische Genexpression beim ACLF liefern. Hierdurch soll die ungeklärte Pathophysiologie des ACLF besser verstanden und Grundlagen für verbesserte Diagnose und Therapie dieses Krankheitsbildes geschaffen werden. Es soll zum Einen untersucht werden, welche biologischen Prozesse (z.B. Inflammation) am akut-auf-chronischen Leberversagen beteiligt sind. Zum Anderen soll versucht werden, einen Biomarker zu identifizieren, der das akut-auf-chronische Leberversagen frühzeitig anzeigt. Die genaue Fragestellung dieser Arbeit umfasst drei Punkte:

1. Von welchen biologischen Prozessen ist das intrahepatische Genexpressionsmuster des akut-auf-chronische Leberversagens (ACLF) geprägt?

Um zu verstehen, welche biologischen Prozesse beim akut-auf-chronischen Leberversagen (ACLF) ablaufen, werden umfangreiche Genexpressionsanalysen (mRNA-Sequenzierung) an Lebergewebe von Tieren des Mausmodells durchgeführt. Das ACLF-Mausmodell besteht aus drei differenziellen Kontrollgruppen (kein Leberschaden, akuter Leberschaden und chronischer Leberschaden) und einer Interventionsgruppe [akut-auf-chronischer Leberschaden (ACLF)]. Dem ACLF scheint ein generelles biologisches System zugrunde zu liegen, wonach das Zusammentreffen zweier schädigender Stimuli erheblich schlimmer ist, als sich aus der Summe des Schädigungspotentials vermuten lässt. Durch den Aufbau des Mausmodells lassen sich die einzelnen Komponenten, welche zum ACLF führen, sowohl einzeln als auch im Zusammenspiel untersuchen. Zudem bietet das Mausmodell die Möglichkeit, Lebergewebe direkt zu untersuchen, was im Menschen, aufgrund der nötigen Invasivität, so nicht möglich wäre. Hierdurch sollen auch die den microRNAs nachgeschalteten biologischen Reaktionswege genauer verstanden werden. Ein Teil der erhobenen Daten soll in dieser Arbeit direkt analysiert

und verarbeitet werden, die übrigen gewonnenen Daten und Erkenntnisse sollen Grundlage für weitere systembiologische Versuchsreihen und Analysen sein.

2. Weist das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF) ein spezifisches intrahepatisches microRNA-Expressionsmuster auf?

Die Analyse von microRNAs beim ACLF beginnt mit der Untersuchung von microRNA-Expressionsprofilen an Lebergewebe von Tieren eines ACLF-Mausmodells. Hierbei sollen microRNAs identifiziert werden, deren intrahepatische Expression sich beim akut-auf-chronischen Leberversagen dezidiert von der bei einer singulären Leberschädigung (akut oder chronisch) unterscheidet. Im Mausmodell identifizierte spezifische microRNAs sollen anschließend in humanen Serumproben bestimmt werden.

3. Gibt es zirkulierende microRNAs im humanen Serum, welche sich als Biomarker für das ACLF eignen?

Zur Verbesserung von Diagnose und Monitoring des ACLF soll ein Biomarker identifiziert werden, welcher spezifisch für das ACLF ist. Aus den unter 3.3.3 aufgeführten Gründen soll das Potential von microRNAs als Biomarker für das ACLF untersucht werden. Die humanen Serumproben stammen von Patienten mit stabiler Leberzirrhose, Patienten mit Leberzirrhose und bakterieller Infektion und von Patienten mit akut-auf-chronischem Leberversagen (nach EASL-CLIF Kriterien). Hierdurch soll die Dynamik der microRNA-Expressionsprofile vom Stadium der chronischen Lebererkrankung über das Vorliegen einer chronischen und akuten Leberschädigung (Vorbedingung des ACLF) bis hin zum definitiven ACLF untersucht werden.

4 Materialien und Untersuchungsgut

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Katalognummer
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	4311235
DNase I, Amplification Grade	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	18068015
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	10777019
Ethanol (absolut)	Supelco Inc. (Pennsylvania, USA)	1.00983.2511
Chloroform (reinst)	Merck (Darmstadt, Deutschland)	K31503031 (Charge)
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)	1017979
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	4352042
RNase-freies Wasser	Qiagen (Hilden, Deutschland)	1017979
96-Well PCR-Platte, Halbrand	Sarstedt AG und Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)	72.1981.202
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG und Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)	95.1994
Pipettenspitzen	Sarstedt AG und Co. KG (Nürnbrecht, Deutschland)	diverse
Nitril Handschuhe	Abena (Aabenraa, Dänemark)	290420

4.2 Kits

Tabelle 5: Kits Untersuchungsgut Mausleber

Produkt	Hersteller	Katalognummer
MiMM-116ZC-miScript microRNA PCR Array	Qiagen (Hilden, Deutschland)	331221
miScript SYBR Green PCR Kit (200)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	218073
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	74104
miRNeasy Mini Kit (50)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	217004
miScript II RT Kit (12)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	218160
Agilent RNA 6000 Nano Reagents	Agilent Technologies (Kalifornien, USA)	5067-1512
NEBNext Multiplex Oligos for Illumina	New England Biolabs (Massachusetts, USA)	E7335S
NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module	New England Biolabs (Massachusetts, USA)	E7490S
NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina	New England Biolabs (Massachusetts, USA)	E7760S

Tabelle 6: Kits Untersuchungsgut humane Serumproben

Produkt	Hersteller	Katalognummer
2x miRNeasy Serum/Plasma Kit (50)	Qiagen (Hilden, Deutschland)	217184
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA)	4366596

4.3 TaqMan MicroRNA-Assays

Für den Nachweis der microRNAs in den humanen Serumproben wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten TaqMan MicroRNA-Assays der Firma Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) mit der Katalognummer 4427975 verwendet. Die Assays enthalten jeweils zwei Röhrchen. Ein Röhrchen mit RT-Primern für die cDNA Synthese und ein Röhrchen mit TaqMan Assay (TaqMan™-Sonden und PCR-Primer Set) für die qPCR.

Tabelle 7: microRNA-Assays für die humanen Serumproben

Primer	Sequenz der microRNA	Assay ID
<i>hsa-let-7b-5p</i>	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	002619
<i>hsa-let-7c-5p</i>	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	000379
<i>hsa-mir-148a-3p</i>	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	000470
<i>hsa-mir-21a-5p</i>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	000397
<i>hsa-mir-23a-3p</i>	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	000399
<i>hsa-mir-25-3p</i>	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	000403
<i>hsa-mir-29c-3p</i>	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	000587
<i>hsa-mir-16-5p</i>	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	000391

4.4 Instrumente und Geräte

Tabelle 8: Instrumente und Geräte

Produkt	Hersteller
Nanodrop ND1000 (Spektralphotometer)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Thermocycler T3 (Thermozykler)	Biometra (Jena, Deutschland)
7500 Fast Real-Time PCR System (PCR-System)	Applied Biosystems (Kalifornien, USA)
Zentrifuge 5417 R (Laborzentrifuge)	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Acculab Atilon (Waage)	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Tissuelyser LT (Gewebehomogenisator)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Vortex Genie 2 (Laborschüttler)	Scientific Industries Inc. (New York, USA)
2100 Bioanalyzer System	Agilent Technologies (Kalifornien, USA)
Sigma 4-15 C (Laborzentrifuge)	SIGMA Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
NextSeq500 (Sequenzierautomat)	Illumina (Kalifornien, USA)

4.5 Mäuse

4.5.1 *C57BL/6J*-Wilytyp Mäuse

Der *C57BL/6J*-Inzuchtstamm des Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA) ist einer der meistverwendeten Maus-Inzuchtstämme in der biomedizinischen Forschung. Per Definition werden Inzuchtstämme durch strikte Bruder-Schwester Verpaarung über mindestens 20 Generationen generiert. Der *C57BL/6*-Inzuchtstamm wurde bereits 1921 von C.C. Little etabliert, aus diesem entstand später der in dieser Arbeit verwendete *C57BL/6J*-Substamm. Der *C57BL/6J*-Substamm, war der erste Inzuchtstamm dessen Genom sequenziert wurde,

weshalb ausführliche genetische Daten zu diesem Inzuchtstamm öffentlich zugänglich sind [23].

4.5.2 *Abcb4*-defiziente Mäuse

Um die chronische Leberschädigung zu modulieren, wurden *Abcb4*-defiziente Mäuse verwendet. Die *Abcb4*-defizienten Mäuse mit dem genetischen Hintergrund des *C57BL/6J*-Inzuchtstamm wurden freundlicherweise von R. Barikbin und D. Goldenberg zur Verfügung gestellt. Das *Abcb4* (auch *Mdr2*) Gen kodiert für eine kanalikuläre Phospholipidflippase, die in der Hepatozytenmembran sitzt und Phospholipide in die Gallenflüssigkeit sezerniert. Mäuse, bei denen das *Abcb4*-Gen ausgeschaltet ist, haben einen Mangel an Phospholipiden in der Gallenflüssigkeit. Durch die veränderte Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit kommt es zur Schädigung des Gallengangepithels, welche in morphologischen Veränderungen ähnlich einer primär sklerosierenden Cholangitis (PSC) mündet. Dieser Pathomechanismus ist gut untersucht und häufig reproduziert, weshalb sich dieses Mausmodell gut eignet, um eine Leberfibrose zu modulieren [107].

4.6 Humane Serumproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Serumproben aus unterschiedlichen Studien und mit unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten verwendet. Achtundsechzig der Blutproben entstammen aus dem LHomFor-Projekt der Klinik für Innere Medizin II des Universitätsklinikums des Saarlandes, in das Patienten mit gesicherter Leberzirrhose eingeschlossen wurden. Die Kennnummer des Ethikkomitees des Universitätsklinikums des Saarlandes für diese Proben lautet 271/11. Sechszwanzig weitere humane Serumproben wurden durch eine Kooperation mit Herrn Univ. Prof. Dr. med. Tony Bruns bereitgestellt. Diese Serumproben entstammen aus der Biobank des Universitätsklinikums Jena. Die Kennnummern des Ethikkomitees des Universitätsklinikums Jena für diese Proben lauten 2880-08/10 und 3683-02/3. In das Kontrollkollektiv wurden sieben dem Ärzte-, Labor- und Pflegepersonal zugehörige Probanden, die keine Anzeichen für eine Lebererkrankung oder eine akute Infektion hatten, eingeschlossen.

5 Methoden

5.1 Expressionsanalysen am Mausmodell

5.1.1 Allgemeines zum ACLF-Mausmodell

Tabelle 9: Das Mausmodell

Mausstamm/ Injektionslösung	Alter	<i>C57BL/6J</i>-Wildtyp	<i>Abcb4</i>-Defizienz
Kontroll-Injektion (NaCl 0,9%)	15 Wochen	6 Weibchen/6 Männchen	6 Weibchen/6 Männchen
Lipopolysaccharid- Injektion (LPS)	15 Wochen	6 Weibchen/6 Männchen	6 Weibchen/6 Männchen
Versuchstiere insgesamt: 48			

Zu Beginn dieser Arbeit lagen die Leberproben der Mäuse bereits vor. Für die Versuche wurden vier Gruppen zu je 12 Versuchstieren (6 Männchen/6 Weibchen) gebildet (Tabelle 9). Zwei Gruppen, welche nicht vorerkrankte Lebern modulierten, bestanden aus 15 Wochen alten *C57BL/6J*-Wildtyp Mäusen (WT). Zwei weitere Gruppen, welche chronisch vorerkrankte Lebern modulierten, bestanden aus 15 Wochen alten *Abcb4*-defizienten Mäusen (*Abcb4*-Defizienz). Um den akuten Auslöser des ACLF darzustellen, wurden sowohl einer Gruppe der *C57BL/6J*-Wildtyp Mäuse als auch einer Gruppe *Abcb4*-defizienten Mäusen Lipopolysaccharide (LPS) (4mg/kg/KG) als Einmaldosis intraperitoneal injiziert. Die *C57BL/6J*-Wildtyp Mäuse mit Lipopolysaccharid-Injektion stellen eine akute Leberschädigung dar, wohingegen die *Abcb4*-defizienten Mäusen mit Lipopolysaccharide-Injektion das akut-auf-chronische Leberversagen darstellen, weshalb letztere fortan auch als ACLF-Mäuse bezeichnet werden. Die andere Gruppe der *C57BL/6J*-Wildtyp Mäuse diente als Kontrollgruppe, ihnen wurde NaCl 0,9% in äquivalenter Menge als Einmaldosis intraperitoneal injiziert. Die zweite Gruppe der *Abcb4*-defizienten Mäusen stellt eine chronische Leberschädigung dar, auch diese Tiere erhielten eine Einmaldosis NaCl 0,9% in äquivalenter Menge als intraperitoneale Injektion. Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien und starke Endotoxine für den Körper von Säugetieren. Wie andere PAMPs binden sie nach ihrer Freisetzung an entsprechende Rezeptoren, sogenannte PRRs und lösen eine starke proinflammatorische Immunreaktion aus [36]. Da der häufigste bekannte Auslöser des ACLF eine akute bakterielle Infektion ist [8], stellt die intraperitoneale Injektion von LPS eine geeignete Methode dar, um den akuten Auslöser des ACLF zu modulieren. Um

Verzerrungen durch die intraperitoneale Injektion auszuschließen, wurde den anderen Tieren NaCl 0,9% intraperitoneal injiziert. NaCl 0,9% ist eine isotonische Lösung, die keine Effekte auf das Immunsystem hat und somit als Kontrollsubstanz dient. Sechs Stunden nach der Injektion wurden alle Tiere narkotisiert und getötet, um Blut und Organe zu entnehmen. Schlussendlich bestand das Mausmodell aus vier unterschiedlichen Gruppen, die in Tabelle 10 dargestellt sind:

Tabelle 10: Nomenklatur der Versuchsgruppen

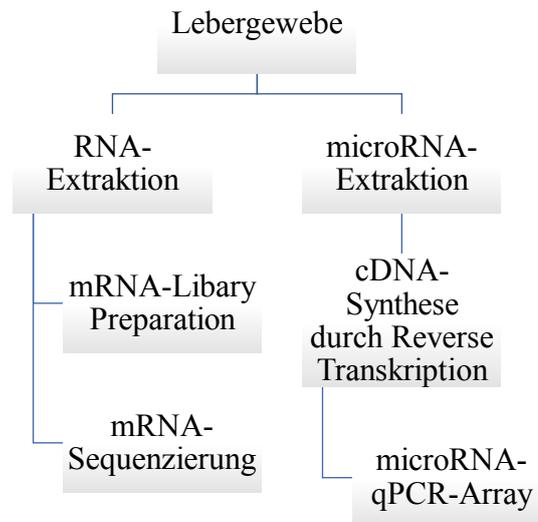
Injektionslösung/Mausstamm	C57BL/6J-Wildtyp	Abcb4-Defizienz
Kontrolle (NaCl 0,9%)	WT + NaCl (Kontrollgruppe)	<i>Abcb4</i> -Defizienz + NaCl (chronischer Leberschaden)
LPS-Injektion	WT + LPS (akuter Leberschaden)	<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS (ACLF)

Die eigentliche Interventionsgruppe ist die Gruppe der Mäuse mit *Abcb4*-Defizienz + LPS (ACLF). Diese Gruppe gilt es zu untersuchen, da sie das ACLF am besten darstellt. Die anderen drei Gruppen können auch als differenzielle Kontrollgruppen bezeichnet werden. Sie stellen, neben dem gesunden Normalzustand, einzelne Komponenten des ACLF dar und ermöglichen Rückschlüsse darauf, welche Veränderungen die duale Leberschädigung beim ACLF (akut auf chronisch) von einer singulären Leberschädigung (akut oder chronisch) unterscheidet.

5.1.2 Strukturierung der Expressionsanalysen

Aus jeder der vier Gruppen wurden zufällig drei männliche Mäuse für weitere Untersuchung ausgewählt. Somit wurden in den Folgeexperimenten Lebergewebe von insgesamt zwölf Tieren untersucht. In dieser Arbeit wurden verschieden Versuche zur Expressionsanalyse an diesem Lebergewebe durchgeführt. Zuerst wurde die Gesamt-RNA extrahiert, die später zur mRNA-Sequenzierung verwendet wurde. Anschließend wurde microRNA extrahiert, welche später für ein leberspezifisches microRNA-qPCR-Array verwendet wurde (Abbildung 7).

Abbildung 7: Arbeitsschritte Mausmodell



Zur bestmöglichen Wahrung der RNA-Integrität, waren alle Leberproben bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert. Um die Kontamination der Proben mit den ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen zu verhindern, wurden die Versuche stets unter hohen hygienischen Standards und unter der Verwendung von Handschuhen durchgeführt [126].

5.1.3 mRNA-Sequenzierung

Die mRNA-Sequenzierung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Epigenetik des Fachbereiches Biowissenschaften, Genetik / Epigenetik der Universität des Saarlandes und Herrn Dr. Sen Qiao vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durchgeführt.

5.1.3.1 RNA-Extraktion

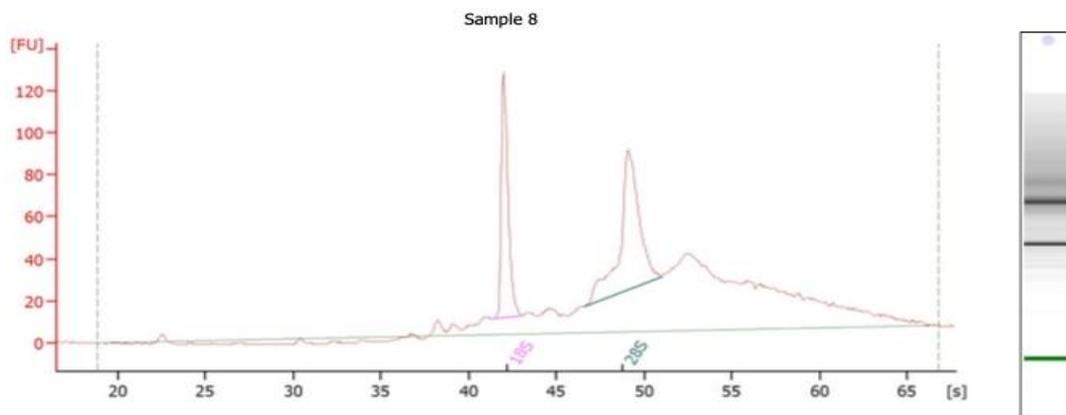
Für diesen Versuch wurde das RNeasy Mini Kit (50) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Als Ausgangsmaterial wurden von jeder der zwölf zufällig ausgewählten Mäuse (3 pro Gruppe) 10 mg Leber abgewogen und jeweils in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Der Probe wurden 600 μl RLT-Puffer und 10 μl β -Mercaptoethanol zugegeben und sie wurde mit einem Laborrührer für 30 Sekunden bei 50 Hz homogenisiert. Zu der Probe wurden 600 μl Ethanol gegeben und sie wurde durch Pipettieren durchmischt. Siebenhundert μl der Probe wurden in ein RNeasy Spin Column, welches in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert war, gegeben. Die Lösung wurde 15 Sekunden bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 8 000

zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun begannen die Waschschritte, um die RNA von den übrigen Nukleinsäuren zu trennen und schlussendlich aus der Membran des RNeasy Spin Column freizusetzen. Es wurden 700 µl RWT-Puffer in das RNeasy Spin Column gegeben und es wurde für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 8 000 zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der gleiche Schritt mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt. Danach wurden erneut 500 µl RPE-Puffer in das RNeasy Spin Column gegeben und es wurde bei einer G-Zahl von 8 000 für zwei Minuten zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß samt Durchfluss wurde verworfen und das RNeasy Spin Column in einem neuen 2 ml Reaktionsgefäß platziert. Um die Membran des RNeasy Spin Columns zu trocknen, wurde es mit geöffnetem Deckel bei einer G-Zahl von 18 000 zentrifugiert. Nachdem das RNeasy Spin Column in einem neuen 1,5 ml Sammelgefäß platziert war, wurde die RNA eluiert. Hierzu wurden 30 µl RNase freies Wasser direkt in das Zentrum der Membran pipettiert und das RNeasy Spin Column für eine Minute bei einer G-Zahl von 8 000 zentrifugiert. Das Eluat befand sich nun in dem 1,5 ml Sammelgefäß und wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei - 80° C gelagert, während das RNeasy Spin Column verworfen wurde.

5.1.3.2 RNA-Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung

Da die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung maßgeblich von der Qualität der extrahierten RNA abhängen wurde das RNA-Eluat vor seiner weiteren Verwendung, auf seine Qualität hin überprüft. In dieser Arbeit wurde das 2 100 Bioanalyser System mit dem Agilent RNA 6 000 Nano-Kit für die Qualitätsbestimmung der RNA verwendet (Abbildung 8). Dieses System trennt die RNA-Proben mittels Gelelektrophorese nach Größe und Konzentration auf. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese werden mit einem Fluoreszenzdetektor erfasst und sowohl aus Elektropherogramm als auch als gelähnliche Bilder dargestellt [101]. Der Versuch wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt [3].

Abbildung 8: Ergebnisse des Agilent Bioanalyzer 2 100



Overall Results for sample 8 : Sample 8

RNA Area:	1,053.9	RNA Integrity Number (RIN):	8.7 (B.02.08)
RNA Concentration:	6,970 ng/ μ l	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.4	Result Flagging Label:	RIN: 8.70

Fragment table for sample 8 : Sample 8

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	41.37	42.97	120.4	11.4
28S	46.60	51.00	172.0	16.3

Die Qualität der RNA wird mithilfe der von Agilent Technologies (Kalifornien, USA) entwickelten RNA-Integritätsnummer (RIN) ausgedrückt. Anders als bei herkömmlichen Methoden zur RNA-Qualitätsbestimmung wird zur Berechnung dieses Wertes das gesamte Elektropherogramm und nicht nur der 18S/28S ribosomale Quotient berücksichtigt. Der sogenannte RIN-Wert skaliert auf eine Skala von 1,0 bis 10. Hierbei entspricht ein RIN-Wert von 1 einer komplett degradierten RNA und ein RIN-Wert von 10 einer vollständig intakten RNA [101]. Für diese Arbeit wurden nur Eluate mit RIN-Werten größer als 8,0 verwendet.

5.1.3.3 Isolation der messengerRNA aus der Gesamt-RNA

Die extrahierte RNA enthält nicht nur die für die Transkriptomanalyse relevante messengerRNA (mRNA), sondern auch eine Vielzahl anderer RNA-Moleküle, die für diesen Versuch irrelevant sind. Um präzise Informationen nur über die Expression der mRNA zu erhalten, müssen diese von der restlichen RNA separiert werden. Hierfür wurde das NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Iso Kit der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Im Unterschied zu der übrigen RNA verfügt mRNA an ihrem 3'-Ende über einen Poly-A-Schwanz aus 30 - 200 Adenin-Nukleotiden. Das mRNA Magnetic Iso Kit macht sich diesen Umstand zunutze. Es verfügt über paramagnetische Beads die an Oligo d(T)₂₅-Primer gebunden sind. Der Poly-A-Schwanz der mRNA bindet an die Oligo d(T)₂₅-Primer und der Komplex kann durch die Beads isoliert werden, während die übrige RNA verworfen wird.

5.1.3.4 Erstellen einer Sequenzierbibliothek

Bevor die eigentliche Sequenzierung der mRNA beginnen kann, muss eine Sequenzierbibliothek erstellt werden. Für diese sogenannte „Library Preparation“ wurden das NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina und die NEBNext Multiplex Oligos for Illumina der Firma New England Biolabs (Massachusetts, USA) gemäß den Herstellerangaben verwandt. Dieser Prozess beginnt mit der Fragmentierung der mRNA durch hohe Temperaturen. Danach werden die mRNA-Fragmente durch reverse Transkription in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Anschließend werden die Enden der doppelsträngigen cDNA repariert und die 3'-Enden mit dAMP versehen. Der nächste Schritt ist die Ligation spezieller Adapter an diese dAMP-Moleküle. Als letzter Schritt zur Erstellung der Sequenzierbibliothek erfolgte die Amplifikation der mit einem Adapter ligierten cDNA mittels PCR.

5.1.3.5 Sequenzierung

Die eigentliche Sequenzierung der mRNA wurde durch die Arbeitsgruppe Epigenetik des Fachbereiches Biowissenschaften, Genetik und Epigenetik der Universität des Saarlandes durchgeführt. Hierfür wurde das NextSeq 500 System der Firma Illumina (Kalifornien, USA) mit einer Leselänge von 1 x 75 Basenpaaren verwandt.

5.1.3.6 Aligment der Sequenzen

Die Aufarbeitung und Analyse der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung wurde von Herrn Dr. Sen Qiao vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durchgeführt. Die Rohdaten der Illumina HiSeq-Plattform wurde auf ihre Qualität kontrolliert (FatsQC version 0,11.2) und es wurden sowohl Basen mit schlechter Qualität als auch Adaptersequenzen entfernt [cutadapt v1.4.1 (Martin, 2011) Wrapper: Trim Galore! Version 0,3.3]. Das Mapping der Reads wurde mittels STAR v2.3.0fl durchgeführt.

5.1.3.7 Identifikation von differential exprimierten Genen [Differentially expressed Genes (DEGs)]

Dieser Schritt wurde ebenfalls von Herrn Dr. Sen Qiao vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durchgeführt. Zur Identifikation von Differentially expressed Genes (DEGs) wurde Cuffdiff v2.2.1 (Trapnell *et al.*, 2010) mit Gencode (Harrow *et al.*, 2006) und Mouse Annotation

(Version M2) als Referenz verwendet. Nur Transkripte mit einem \log_2 (fold change) von $> \pm 1$ und einem p-Wert $< 0,05$ wurden als DEGs betrachtet. Die Ergebnisse wurden als Excel-Datei zur Verfügung gestellt.

5.1.3.8 Gene-Ontology Anreicherungsanalysen [Gene Ontology (GO) term enrichment] und KEGG-Pfadanalyse [KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway]

Zur Ermittlung von biologischen Prozessen, die an der Pathophysiologie des ACLF beteiligt sind, wurden Gene-Ontology Anreicherungsanalysen und KEGG-Pfadanalysen mittels GeneTrail 3.2 (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de>) durchgeführt [55,56]. Die 145 DEGs welche nur in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) exprimiert wurden, dienten als Ausgangsdaten für die Analysen. Die Analysen wurden mit den vorgeschlagenen Parametern durchgeführt („Over-representation analysis, Null-hypothesis: Two-Side, Benjamini-Yekutieli Test, Significance level: 0,05“). Für die Gene-Ontology Anreicherungsanalysen wurden nur die Teildatenbanken für biologische Prozesse (GO - Biological Process) zur Analyse ausgewählt. Die KEGG-Pfadanalyse fand in einem separaten Schritt statt, hierfür wurden ebenso GeneTrail 3.2 (<http://genetrail.bioinf.uni-sb.de>) und die genannten Parametern verwandt. Für beiden Analysen wurden alle unterstützten Gene als Referenz gewählt.

5.1.4 microRNA PCR-Array

Im Verlauf der letzten Jahre wurden microRNAs mit zahlreichen menschlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht [12]. Mit wachsendem Interesse der Wissenschaft an microRNAs und ihrer Rolle bei Krankheiten wurden Produkte auf den Markt gebracht, welche es ermöglichen krankheitsbezogene microRNAs zu identifizieren. Ein solches Produkt ist das, in dieser Arbeit verwendete, microRNA PCR-Array der Firma Qiagen. Es ermöglicht den gezielten Nachweis von microRNAs, die bereits im Zusammenhang mit der jeweiligen Erkrankung beschrieben wurden. Die Firma Qiagen gibt an, die Arrays regelmäßig an neue wissenschaftliche Erkenntnisse anzupassen. Die Schritte die notwendig sind, um von der Probe zu den Messergebnissen zu kommen sind im Folgenden beschrieben.

5.1.4.1 microRNA Extraktion

Für die microRNA-Extraktion wurde das miRNeasy Mini Kit (50) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Im Unterschied, zu dem oben beschriebenen RNeasy Mini Kit (250)

ermöglicht dieses Kit, neben der Extraktion der Gesamt-RNA, auch die Extraktion kleinerer RNA-Moleküle (< 200 Nukleotide), wie es auch microRNAs sind.

Es wurden 10 mg Leber abgewogen, zusammen mit QIAzol Lysis Reagent in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit einem Laborrührer für 30 Sekunden bei 50 Hz homogenisiert. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (18 - 24 °C) wurden der Probe 140 µl Chloroform hinzugegeben und sie wurde für fünfzehn Sekunden kräftig geschüttelt. Nach erneuter zweiminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Probe für fünfzehn Minuten bei 4° C und einer G-Zahl von 12 000 zentrifugiert. Der wässrige Überstand der Probe wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und das 1,5fache Volumen Ethanol hinzugegeben. Siebenhundert µl der Lösung wurden in ein RNeasy Mini spin Column, welches in einem 2 ml Sammelgefäß platziert war, gegeben. Der gleiche Schritt wurde mit dem Rest der Probe wiederholt. Die nun folgenden Waschschrte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt und sind identisch mit denen unter 5.1.3.1 beschriebenen. Am Ende des Versuches erhielt man 30 µl RNA-Eluat, welches bis zu seiner weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert wurde.

5.1.4.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Mithilfe eines Spektralphotometers (Nanodrop ND1000) wurden die RNA-Konzentration und Reinheit des Eluats bestimmt. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wird 1 µl des Eluats auf den Sensor gegeben und die Lichtabsorption bei 260 nm gemessen. 260 nm entsprechen dem Absorptionsmaximum sämtlicher RNAs. Eine weitere Messung bei 280 nm misst die Proteinkonzentration des Eluats. Anschließend wird das Verhältnis der beiden Messungen 260/280 gebildet. Werte oberhalb von 2,0 sprechen hier für eine hohe Reinheit des Eluats [103]. Das Gerät gibt die RNA-Konzentration in ng/µl an. Das Eluat wurde bis zu seiner weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

5.1.4.3 cDNA-Synthese aus microRNAs

Da die, in der qPCR verwendete, DNA-Polymerase keine microRNA als Substrat akzeptiert, ist es notwendig, die extrahierte microRNA in eine komplementäre DNA, die sogenannte cDNA umzuwandeln. Dies geschah durch Reverse Transkription unter Verwendung des miScript II RT Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Das Kit enthält zwei verschiedene Puffer, von denen einer, je nach Folgeexperiment, ausgewählt wird. In diesem Versuch wurde das Kit mit dem 5 x miScript HiSpec Buffer gemäß den Herstellerangaben verwendet. Es

wurden folgender Reaktionsansatz (Tabelle 11) gewählt und jeweils in Reaktionsgefäß pipettiert:

Tabelle 11: Reaktionsansatz cDNA-Synthese aus microRNA

Reagenz	Volumen
5 x miScript HiSpec Buffer	4 µl
10 x miScript Nucleics Mix	2 µl
Template microRNA	10 ng pro Reaktion
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNase-freies Wassers	Bis 20 µl auffüllen (variabel)
Gesamtvolumen	20 µl

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in den Thermozykler gegeben und die Reaktion wurde gemäß dem Programm in Tabelle 12 durchgeführt.

Tabelle 12: Reaktionsschritte im Thermozykler

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	60 Minuten	37 °C
Inaktivierung Reverse Transkriptase	5 Minuten	95 °C
Hold	∞	4 °C

Abschließend wurden alle Reaktionsgefäße bis zu ihrer weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

5.1.4.4 Leberspezifisches microRNA-PCR-Array

Um herauszufinden, welche microRNAs in die Pathogenese des ACLF involviert sind, wurde die Expression von 84 leberspezifischen microRNAs mit MiMM-116ZC-miScript microRNA PCR Array in Kombination mit dem miScript SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) untersucht (Abbildung 9). Neben den Assays für die 84 leberspezifischen microRNAs enthält die 96 Well PCR-Platte noch Assays zum Nachweis von *C. elegans* miR-39 miScript, snoRNA/snRNA, microRNA reverse transcription control und Positive PCR Control als Kontrollen. In jedem einzelnen Well befinden sich bereits Primer für eine

spezifische microRNA, die schon im Zusammenhang mit Lebererkrankungen beschrieben wurde.

Abbildung 9: MicroRNAs im MiMM-116ZC-miScript PCR-Array

GeneGlobe catalog number	MIMM-116Z
miRNAs	cel-miR-39-3p, mmu-let-7a-5p, mmu-let-7b-5p, mmu-let-7c-5p, mmu-let-7f-5p, mmu-let-7g-5p, mmu-let-7i-5p, mmu-miR-100-5p, mmu-miR-101a-3p, mmu-miR-103-3p, mmu-miR-106b-5p, mmu-miR-107-3p, mmu-miR-122-5p, mmu-miR-125a-5p, mmu-miR-125b-5p, mmu-miR-126a-5p, mmu-miR-126a-3p, mmu-miR-130a-3p, mmu-miR-139-5p, mmu-miR-142a-5p, mmu-miR-142a-3p, mmu-miR-143-3p, mmu-miR-145a-5p, mmu-miR-146a-5p, mmu-miR-148a-3p, mmu-miR-148b-3p, mmu-miR-150-5p, mmu-miR-151-5p, mmu-miR-152-3p, mmu-miR-15a-5p, mmu-miR-15b-5p, mmu-miR-16-5p, mmu-miR-17-5p, mmu-miR-181b-5p, mmu-miR-186-5p, mmu-miR-191-5p, mmu-miR-192-5p, mmu-miR-192-3p, mmu-miR-194-5p, mmu-miR-195a-5p, mmu-miR-199a-5p, mmu-miR-199a-3p, mmu-miR-19a-3p, mmu-miR-19b-3p, mmu-miR-1a-3p, mmu-miR-200b-3p, mmu-miR-20a-5p, mmu-miR-20b-5p, mmu-miR-214-3p, mmu-miR-21a-5p, mmu-miR-22-3p, mmu-miR-22-5p, mmu-miR-221-3p, mmu-miR-222-3p, mmu-miR-223-3p, mmu-miR-23a-3p, mmu-miR-23b-3p, mmu-miR-24-3p, mmu-miR-25-3p, mmu-miR-26a-5p, mmu-miR-26b-5p, mmu-miR-27a-3p, mmu-miR-27b-3p, mmu-miR-29a-3p, mmu-miR-29a-5p, mmu-miR-29b-3p, mmu-miR-29c-3p, mmu-miR-30a-5p, mmu-miR-30b-5p, mmu-miR-30c-5p, mmu-miR-30d-5p, mmu-miR-30e-5p, mmu-miR-30e-3p, mmu-miR-322-5p, mmu-miR-34a-5p, mmu-miR-365-3p, mmu-miR-370-3p, mmu-miR-374b-5p, mmu-miR-375-3p, mmu-miR-378a-3p, mmu-miR-451a, mmu-miR-497a-5p, mmu-miR-92a-3p, mmu-miR-93-5p, mmu-miR-99a-5p

Ein Reaktionsansatz (Tabelle 13), der die übrigen Bausteine für eine PCR-Reaktion und die cDNA-Proben enthielt wurde hergestellt und der Platte hinzugefügt. Die cDNA Proben aus 5.1.4.3 wurden vor ihrer Verwendung aufgetaut und im Verhältnis 1:10 verdünnt, somit wurde der 20 µl Probe 180 µl RNase-freies Wassers zugefügt. Der Versuch wurde mit dem 7500 Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems (Kalifornien, USA) durchgeführt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz microRNA Array

Reagenz	Volumen
QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375 µl
miScript universal Primer	275 µl
RNase-freies Wassers	1000 µl
cDNA Probe	100 µl
Gesamt	2750 µl

Nachdem alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18 - 24 °C) aufgewärmt waren, wurde in jedes der 96 Wells der PCR-Platte 25 µl des Reaktionsansatzes gegeben. Anschließend wurde die PCR-Platte mit optisch klarer Klebefolie versiegelt und bei einer G-Zahl von 1 000 für eine Minute zentrifugiert. Die PCR-Platte wurde in das PCR-System eingeführt und für 15 Minuten auf 95 °C erwärmt, um die Taq-DNA-Polymerase zu aktivieren. Anschließend durchlief das qPCR-System den folgenden Zyklus (Tabelle 14) 45-mal.

Tabelle 14: PCR-Zyklus

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung der cDNA	15 Sekunden	94 °C
Primer-Hybridisierung	30 Sekunden	55 °C
DNA-Synthese	35 Sekunden	70 °C

Das qPCR-System ermöglicht die zeitgleiche Vervielfältigung und Quantifizierung spezifischer cDNA-Sequenzen. Neben einem klassischen Thermozykler enthält es auch einen Fluoreszenzdetektor, der Lichtstrahlung erfassen kann. Es existieren verschiedene Möglichkeiten der Fluoreszenzmessung für die qPCR. Für diesen Versuch wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zur Quantifizierung des Amplikons verwendet, er lagert sich an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA an und wird dann von einem Fluoreszenzdetektor erfasst. Mit jedem neuen PCR-Zyklus erhöht sich die Menge des doppelsträngigen Amplikons und somit auch das Fluoreszenzsignal. Da sich in jedem einzelnen Well nur die spezifischen Primer für eine microRNA befinden, wird somit auch, mit jedem PCR-Zyklus, nur diese microRNA in ihrem entsprechenden Well amplifiziert und quantifiziert [62]. Nach der manuellen Festlegung von Baseline und Threshold, wurden die aus dem Lauf generierten Ct-Werte zur Analyse in das webbasierte GeneGlobe Data Analysis Center [142] der Firma Qiagen eingefügt.

5.2 microRNA-mRNA-Interaktionen

Um Verbindungen zwischen den Ergebnissen der mRNA-Sequenzierung und den microRNA-Arrays herzustellen, wurde das Webtool „miRTargetLink 2.0“ verwendet [82]. Es wurden der Menüpunkt „Target Gene Centric Search“ für den Modellorganismus Maus ausgewählt und die Liste mit allen 145 DEGs (siehe: Kapitel 6.2) eingefügt. Anschließend wurden nur Interaktionen mit miRNAs ausgewählt, welche bereits sicher experimentell (z.B. qPCR) validiert wurden („strong validated“). Die anschließende Liste der microRNA-mRNA-

Interaktionen („Interaction table“) wurde nach den sieben identifizierten microRNAs (siehe: Kapitel 6.3) durchsucht.

5.3 Humane Serumproben

5.4 Auswahl der Patientenkohorten

Ziel der Versuche mit den humanen Serumproben war es, einen diagnostischen Marker zu identifizieren, welcher das akut-auf-chronische-Leberversagen sicher und frühzeitig anzeigt. Um diesem Anspruch trotz der Knappheit an Serumproben von Patienten mit ACLF, gerecht zu werden, wurde hier folgender zweistufiger Ansatz gewählt. In einem ersten Schritt wurde die Expression der im Tiermodell identifizierten microRNAs bei Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller Infektion (< 2 Wochen von Diagnose der bakteriellen Infektion bis zur Blutentnahme) im Vergleich zu Patienten mit Leberzirrhose und gesunden Probanden gemessen. Als bakterielle Infektion wurden Infektionen unterschiedlicher Organsysteme (Pneumonie, Harnwegsinfekt, spontan bakterielle Peritonitis) definiert, welche eine Behandlung mit Antibiotika erforderten. All diese Infektionen sind in der Literatur akzeptierte Trigger des ACLF [25,99]. Die Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller Infektion erfüllen alle Bedingungen, um ein ACLF zu entwickeln und verhalten sich analog zu Gruppe 3 (*Abcb4*-Defizienz + bakterielle Infektion) des Mausmodells. Die in Tabelle 15 aufgeführten Serumproben entstammen der LHomFor-Biobank des Universitätsklinikums des Saarlandes.

Tabelle 15: Patientenkohorte LHomFor

Kohorte	Patientenanzahl	Durchschnittsalter (Jahre)	Geschlecht m/w
Leberzirrhose	41	60,8	27/14
Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion	11	59,7	9/2
Kontrollgruppe	7	40,6	2/7

Nachdem in diesem ersten Schritt eine vielversprechende microRNA (*mir-148a-3p*) identifiziert werden konnte, wurde diese microRNA in einer weiteren Kohorte von an ACLF (EASL-CLIF Definition) erkrankten Patienten validiert. Auch in dieser Kohorte wurden bakterielle Infektionen unterschiedlicher Organsysteme (Pneumonie, Harnwegsinfekt, spontan bakterielle Peritonitis) berücksichtigt. Die folgenden Serumproben (Tabelle 16) entstammen sowohl einer Biobank des Universitätsklinikums Jena als der LHomFor-Biobank des Universitätsklinikums des Saarlandes.

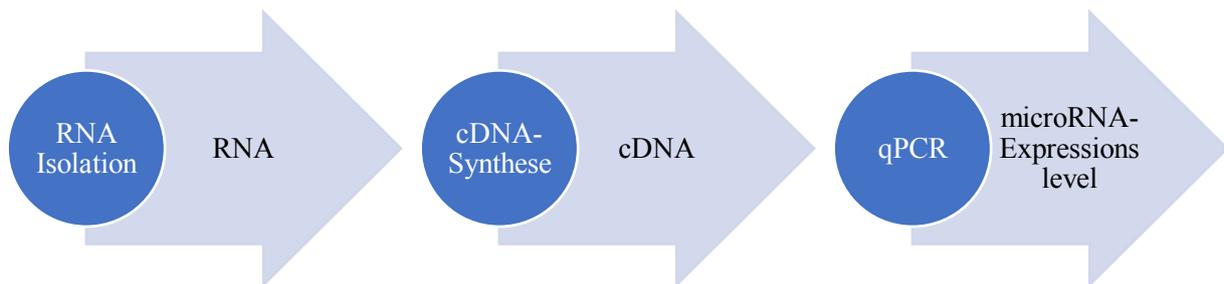
Tabelle 16: Patientenkohorte ACLF

Kohorte	Patientenanzahl	Durchschnittsalter in Jahren (n)	Geschlecht m/w (n)	BI Ja/Nein (n)	ACLF Grad I	ACLF Grad II
ACLF	35	59,9 (31)	22/9 (31)	10/21 (31)	9	26

5.4.1 MicroRNA-Quantifizierung

Um die Expressionslevel der microRNAs in den humanen Serumproben quantifizieren zu können waren mehrere Schritte notwendig (Abbildung 10). Zuerst wurde die Gesamt-RNA inklusive der microRNAs, aus den Serumproben extrahiert. Daraufhin wurden die ausgewählten microRNA-Sequenzen in cDNA umgeschrieben, welche anschließend mittels qPCR quantifiziert wurde.

Abbildung 10: Arbeitsschritte humane Serumproben



5.4.1.1 microRNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus den humanen Serumproben wurde mit dem miRNeasy Serum/Plasma Kit (50) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Zuerst wurde der mitgelieferten RPE Pufferlösung 44 ml und der mitgelieferten RWT Pufferlösung 30 ml Ethanol (100%) zugesetzt. Danach wurden die Serumproben bei Raumtemperatur aufgetaut, bis sie vollständig flüssig vorlagen. Als Ausgangsmaterial wurden 200 µl Serum in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Dann wurde 1 ml QIAzol Lysis Reagent hinzugegeben und die Lösung wurde durch Pipettieren durchmischt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur (18 - 24 °C) wurden der Lösung 200 µl Chloroform hinzugegeben und sie wurde für 15 Sekunden in einem Laborschüttler durchmischt. Die Lösung wurde erneut für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 15 Minuten bei 4 °C und einer

G-Zahl von 12 000 zentrifugiert. Sechshundert µl des Überstands wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und es wurden 900 µl Ethanol 100% hinzugegeben. Nun wurden 700 µl der Lösung in ein RNeasy MinElute Spin Column, welches in einem 2 ml Reaktionsgefäß platziert war, pipettiert. Das RNeasy MinElute Spin Column (Abbildung 10) wurde für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 8 000 zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der gleiche Schritt mit dem restlichen Überstand aus dem Ursprungsgefäß wiederholt.

Für den ersten Waschschrift wurden dem RNeasy MinElute Spin Column 700 µl RWT Puffer zugeführt, anschließend wurde es für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 8 000 zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen.

Für den nächsten Waschschrift wurden dem RNeasy MinElute Spin Column 500 µl RPE Puffer zugeführt, anschließend wurde es für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 8 000 zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Abschließend wurden dem RNeasy MinElute Spin Column 500 µl 80 % Ethanol zugeführt, wonach es für 15 Sekunden bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 8 000 zentrifugiert wurde. Das 2 ml Reaktionsgefäß wurde mitsamt dem Durchfluss verworfen.

Das RNeasy MinElute Spin Column wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei geöffnetem Deckel für 5 Minuten bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 18 000 zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Abschließend wurde das RNeasy MinElute Spin Column in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. In das Zentrum der Membran wurden 14 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Daraufhin wurde das Sammelröhrchen für eine Minute bei Raumtemperatur und einer G-Zahl von 18 000 zentrifugiert. Schließlich wurde das RNeasy MinElute Spin Column verworfen und die extrahierte RNA befand sich in den 14 µl RNase-freien Wasser. Das RNA-Eluat wurden bis zu seiner weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

5.4.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Analog zu den Mausversuchen wurde auch für die humanen Proben die Qualität und Reinheit der RNA mit Hilfe des Spektralphotometers (Nanodrop ND1000) bestimmt.

5.4.1.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Wie oben bereits beschrieben ist es für die qPCR notwendig die RNA in cDNA umzuschreiben, dies geschah durch reverse Transkription unter Verwendung des TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit in Kombination mit den RT-Primern aus den unter 4.3 beschriebenen TaqMan MicroRNA-Assays, beide von der Firma Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA).

In einem ersten Schritt wurde das RNA-Eluat auf eine Konzentration von 2 ng/μl mit RNase freiem Wasser der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verdünnt. Anschließend wurde folgender Master-Mix (Tabelle 17) aus den Komponenten des TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit hergestellt.

Tabelle 17: cDNA-Synthese Master-Mix

cDNA-Synthese Master-Mix	Volumen für 1 Reaktion	Volumen für 40 Reaktionen
dNTP MIX (100 mM)	0,15 μl	6 μl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase (50 U/μL)	1 μl	40 μl
10 x RT Buffer	1,5 μl	60 μl
RNase Inhibitor (20 U/μL)	0,19 μl	7,6 μl
RNase freies Wasser	4,16 μl	166, 4 μl
Master-Mix (gesamt)	7 μl	280 μl

Für jede der Serumproben wurden insgesamt acht Reaktionsgefäße vorbereitet. In jedes der acht Reaktionsgefäße wurden 7 μl Mastermix und 5 μl RNA-Eluat gegeben. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße mit 3 μl RT-Primern für die jeweiligen microRNAs versetzt. Wenn beispielsweise cDNA-Synthese für fünf humane Serumproben auf einmal durchgeführt wurde, so mussten insgesamt 40 Reaktionsgefäße vorbereitet und Master-Mix für 40 Reaktionen hergestellt werden. Letztendlich befand sich in jedem Gefäß der in Tabelle 18 dargestellte Ansatz.

Tabelle 18: Reaktionsansatz cDNA-Synthese

Komponenten	Volumen
Master-Mix	7 μl
RNA-Eluat (2 ng/μl)	5 μl
RT-Primer (microRNA spezifisch)	3 μl
Gesamt pro Reaktion	15 μl

Somit enthielt jedes Reaktionsgefäß, neben allen weiteren für die reverse Transkription notwendigen Bausteinen, nur die für eine microRNA spezifischen RT-Primer. Dies erlaubte die Synthese von cDNA ausschließlich für die Sequenz der zu untersuchenden microRNA. Am

Ende dieses Versuches wurde in jedem Reaktionsgefäß also nur die Sequenz für eine der microRNAs (*hsa-let-7c-5p*, *hsa-let-7b-5p*, *hsa-mir-148a-3p*, *hsa-mir-21a-5p*, *hsa-mir-23a-3p*, *hsa-mir-25-3p*, *hsa-mir-29c-3p*, *hsa-mir-16-5p*) in cDNA umgewandelt.

Die reverse Transkription erfolgte im Thermozykler, welcher die für die verschiedenen Reaktionsschritte, notwendigen Temperaturen sicherstellte (Tabelle 19).

Tabelle 19: Reaktionsschritte im Thermozykler

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
1	30 Minuten	16 °C
2	30 Minuten	42 °C
3	5 Minuten	85 °C
4	∞	4 °C

Die cDNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung in Reaktionsgefäßen bei – 20 °C gelagert.

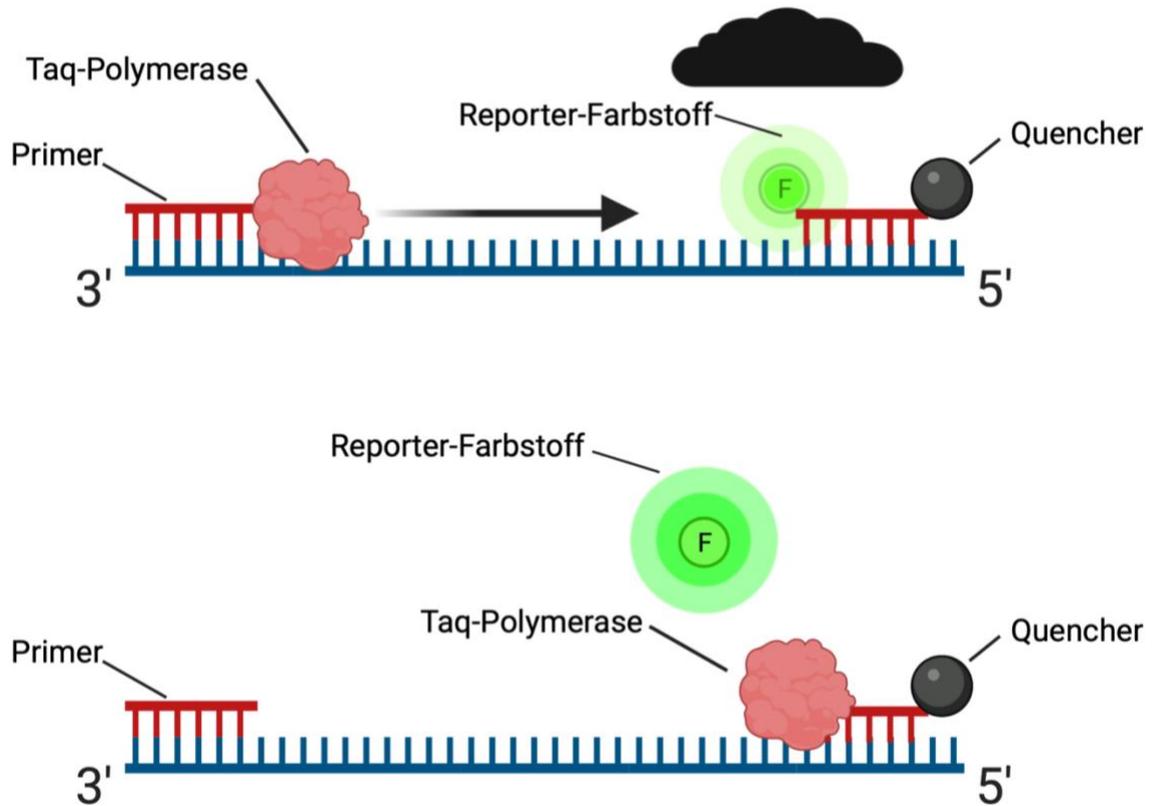
5.4.1.4 qPCR

Um die Expression der microRNAs *hsa-let-7c-5p*, *hsa-let-7b-5p*, *hsa-mir-148a-3p*, *hsa-mir-21a-5p*, *hsa-mir-23a-3p*, *hsa-mir-25-3p*, *hsa-mir-29c-3p* und *hsa-mir-16-5p* in den humanen Serumproben zu untersuchen wurde das 7500 Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems (Kalifornien, USA) in Kombination mit TaqMan MicroRNA-Assays der Firma Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA) verwendet.

Die TaqMan MicroRNA-Assays enthalten jeweils die, für die zu untersuchende microRNA, spezifischen Primer und die sogenannten TaqMan-Proben. Letztere basieren auf dem Prinzip der Fluoreszenzlöschung. Jede TaqMan-Probe ist mit einer sogenannten TaqMan™ -Sonde versehen, hierbei handelt es sich um ein Oligonukleotid, welches sich an die Zielsequenz des 3'-5' cDNA-Strangs anlagert. Als wesentliche Bestandteile enthält die TaqMan™ -Sonde einen Reporter-Farbstoff und einen Quencher. Der Reporter-Farbstoff ist eine fluoreszierende Substanz, deren Signal jedoch durch den Quencher (engl. „Löcher“) ausgelöscht wird, solange beide nahe beieinander liegen. Während der DNA-Synthese, gelangt die Taq-Polymerase an der TaqMan-Sonde vorbei und hydrolysiert diese durch ihre 5'-3' Exonukleaseaktivität. Nun liegt der Reporter-Farbstoff vom Quencher getrennt vor und kann somit frei fluoreszieren (Abbildung 11). Das Fluoreszenzsignal wird in Echtzeit von dem Fluoreszenzdetektor des

PCR-Systems erfasst, wodurch Rückschlüsse auf die Menge des Replikats gezogen werden können [2].

Abbildung 11: qPCR mit TaqMan



Das 7500 Fast Real-Time PCR System ist mit 96-Well PCR-Platten kompatibel. Zuerst wurde der microRNA-spezifische Reaktionsansatz und die entsprechenden cDNA Proben, welche als Matrize für die Amplifikation fungieren, in jedes Well pipettiert (Tabelle 20). Danach wurde die PCR-Platte mit optisch klarer Klebefolie versiegelt und bei einer G-Zahl von 1 000 für eine Minute zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in das PCR-System gegeben und 40 Zyklen nach oben beschriebem Schema (Tabelle 14) durchgeführt.

Tabelle 20: qPCR Inhalt der Wells

Reagenz	Volumen
TaqMan™ MircoRNA Assay (microRNA spezifisch)	0,5 µl
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix	5 µl
RNase-freies Wasser	3,17 µl
Reaktionsansatz	8,67 µl
cDNA-Probe	1,33 µl
Gesamtinhalt des Wells	10 µl

Um Fehlmessungen auszuschließen, wurden alle Proben in Dreifachbestimmung und mit Negativkontrollen gemessen, wie in Tabelle 21 dargestellt.

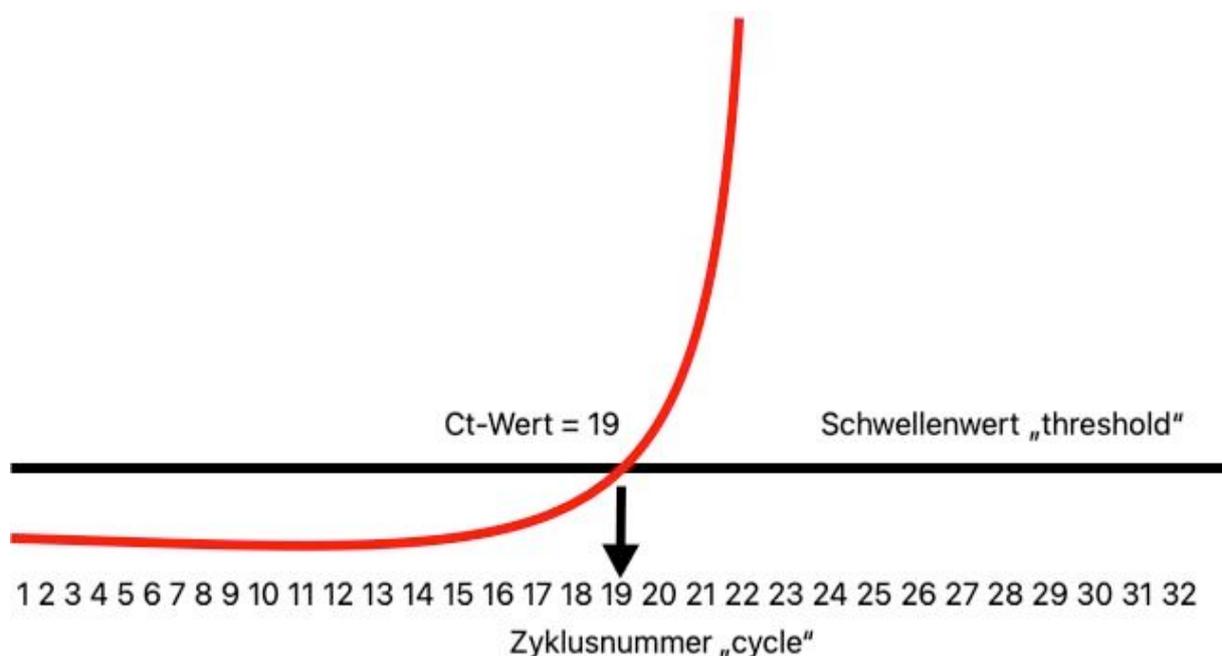
Tabelle 21: Beispielhafte Anordnung der Proben auf einer PCR-Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10-12
A	microRNA 7c Probe 1	microRNA 7c Probe 1	microRNA 7c Probe 1	microRNA 7c Probe 2	microRNA 7c Probe 2	microRNA 7c Probe 2	microRNA 7c Probe 3	microRNA 7c Probe 3	microRNA 7c Probe 3	Negativ- kontrolle
B	microRNA 7b Probe 1	microRNA 7b Probe 1	microRNA 7b Probe 1	microRNA 7b Probe 2	microRNA 7b Probe 2	microRNA 7b Probe 2	microRNA 7b Probe 3	microRNA 7b Probe 3	microRNA 7b Probe 3	Negativ- kontrolle
C	microRNA 148 Probe 1	microRNA 148 Probe 1	microRNA 148 Probe 1	microRNA 148 Probe 2	microRNA 148 Probe 2	microRNA 148 Probe 2	microRNA 148 Probe 3	microRNA 148 Probe 3	microRNA 148 Probe 3	Negativ- kontrolle
D	microRNA 21 Probe 1	microRNA 21 Probe 1	microRNA 21 Probe 1	microRNA 21 Probe 2	microRNA 21 Probe 2	microRNA 21 Probe 2	microRNA 21 Probe 3	microRNA 21 Probe 3	microRNA 21 Probe 3	Negativ- kontrolle
E	microRNA 23 Probe 1	microRNA 23 Probe 1	microRNA 23 Probe 1	microRNA 23 Probe 2	microRNA 23 Probe 2	microRNA 23 Probe 2	microRNA 23 Probe 3	microRNA 23 Probe 3	microRNA 23 Probe 3	Negativ- kontrolle
F	microRNA 25 Probe 1	microRNA 25 Probe 1	microRNA 25 Probe 1	microRNA 25 Probe 2	microRNA 25 Probe 2	microRNA 25 Probe 2	microRNA 25 Probe 3	microRNA 25 Probe 3	microRNA 25 Probe 3	Negativ- kontrolle
G	microRNA 29 Probe 1	microRNA 29 Probe 1	microRNA 29 Probe 1	microRNA 29 Probe 2	microRNA 29 Probe 2	microRNA 29 Probe 2	microRNA 29 Probe 3	microRNA 29 Probe 3	microRNA 29 Probe 3	Negativ- kontrolle
H	microRNA 16 Probe 1	microRNA 16 Probe 1	microRNA 16 Probe 1	microRNA 16 Probe 2	microRNA 16 Probe 2	microRNA 16 Probe 2	microRNA 16 Probe 3	microRNA 16 Probe 3	microRNA 16 Probe 3	Negativ- kontrolle

5.4.1.5 Auswertung der qPCR Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die microRNAs relativ quantifiziert. Die relative Quantifizierung beschreibt die Veränderungen der Expression des Zielgens in einer Probe der Patientengruppe relativ zu der Expression des Zielgens in allen Proben der Kontrollgruppe. Dieser Prozess beginnt mit den C_t -Werten, welche den Rohdaten der qPCR entsprechen. Bei dem sogenannten „cycle-threshold“-Wert handelt es sich um die Nummer des PCR-Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes erstmals über einen festgelegten Schwellenwert „threshold“ steigt.

Abbildung 12: C_t -Wert



Die Software des PCR-Systems berechnet nach 40 Zyklen für jedes Well einen Schwellenwert. Je früher der Schwellenwert erreicht wird, desto kleiner ist der C_t -Wert und umso größer ist die Menge der gesuchten Substanz in der Ausgangsprobe. Als nächstes müssen die C_t -Werte der microRNAs mit Hilfe einer endogenen Kontrolle normalisiert werden. Als endogene Kontrolle eignen sich sogenannte „Housekeeping-Gene“, das sind Proteine, die stabil und unabhängig von äußeren Einflüssen in der Zelle exprimiert werden. Die endogene Kontrolle wird in derselben Probe und demselben Experiment wie die Ziel-microRNA mitgemessen. In dieser Arbeit wurde die microRNA *hsa-miR-16-5p* als endogene Kontrolle verwendet, da sie in zahlreichen Studien untersucht und als geeignet beschrieben wurde [89]. Da die Messungen in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden, lagen sowohl für jede Ziel-microRNA als auch für microRNA *hsa-miR-16-5p* jeweils drei C_t -Werte pro Probe vor. Um die Normalisierung

durchzuführen (Tabelle 22), wurden zuerst die Mittelwerte der Ct-Werte von Ziel-microRNA und microRNA *hsa-miR-16-5p* für jede Probe berechnet.

Tabelle 22: Berechnung des durchschnittlichen Ct-Wertes

Ct-Werte in Dreifachbestimmung	Ct-Wert (Durchschnitt)
33,49	<u>33,29</u>
33,16	
33,22	

Anschließend wurde für jede Probe der Mittelwerte der Ct-Werte der microRNA *hsa-miR-16-5p* von dem Mittelwert der Ct-Werte der Ziel-microRNA subtrahiert. Das Ergebnis dieser Rechnung ist der sogenannte ΔC_t -Wert.

$$\Delta C_{T_{Probe\ x}} = C_{t_{Probe\ x}}(\text{Ziel microRNA}) - C_{t_{Probe\ x}}(\text{microRNA hsa mir 16 5p})$$

Dieser Schritt ist wichtig, da er eventuelle Unterschiede in der Ausgangsmenge der gesamten RNA ausgleicht und so einen Vergleich der Proben untereinander ermöglicht [62]. Um die differentielle Expression der Ziel-microRNAs zwischen den Patientenproben und den Proben der Kontrollgruppe erfassen zu können wurde der $\Delta\Delta C_t$ -Wert berechnet. Hierfür wurde zuerst der Mittelwert der ΔC_t -Werte, für die jeweilige microRNA, aller Proben der Kontrollgruppe gebildet. Anschließend wurde dieser Mittelwert von den ΔC_t -Werten, für die jeweilige microRNA, der Patientenproben subtrahiert. Das Ergebnis dieser Subtraktion ist der $\Delta\Delta C_t$ -Wert [62].

$$\Delta\Delta CT = \Delta C_{t_{Patientenprobe\ x}}(\text{Ziel microRNA}) - \Delta C_{t_{\text{Mittelwert der Kontrollgruppe}}}(\text{Ziel microRNA})$$

Die endgültige Darstellung der Ergebnisse erfolgte über die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode, diese stellt die Veränderung der Expressionslevel der Patientenproben als n-fache Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe dar.

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-\Delta C_{t_{Patientenprobe}}(\text{Ziel miRNA}) - \Delta C_{t_{\text{Mittelwert der Kontrollgruppe}}}(\text{Ziel miRNA})}$$

Zudem werden alle Ergebnisse noch an der Kontrollgruppe normalisiert, damit die Kontrollgruppe in der abschließenden Darstellung als 1,0 erscheint. Hierzu wird der Mittelwert aller Ergebnisse der Kontrollgruppe gebildet und jedes andere gemessene Ergebnis durch diesen Mittelwert dividiert. Dies ermöglicht eine gute Interpretation der differentiellen Expression der jeweiligen microRNA bei Erkrankung im Vergleich zum gesunden Normalzustand [90].

5.5 Statistik

Für die Berechnung der ΔCt -, der $\Delta\Delta Ct$ - und der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Werte wurde die Software Excel der Firma Microsoft (New Mexico, USA) verwendet. Für die Darstellung der Ergebnisse und die Berechnung der Signifikanz wurde die Software GraphPad Prism Version 9.4.1 für MacOS der Firma GraphPad Software (Kalifornien, USA) verwendet. Um verschiedene Parameter zwischen den einzelnen Gruppen zu untersuchen, wurde die Daten zuerst mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Bei Normalverteilung der Daten aller Gruppen wurden eine Varianzanalyse mittels ANOVA durchgeführt und als Post hoc-Test der Tukey`s-Test angewandt. Wenn die Daten in einer oder mehrerer Gruppen nicht normalverteilt waren, wurde die Varianzanalyse mittels des Kruskal-Wallis-Tests durchgeführt als Post hoc-Test der Dunns-Test angewandt. Ein Alpha-Risiko von $\alpha < 0,05$ wurde als statistisch signifikant und ein Alpha-Risiko von $\alpha < 0,1$ als statistischer Trend gewertet. Um die Abhängigkeit zwischen zwei normalverteilten Messwerten zu ermitteln, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Pearson berechnet. Bei nicht normalverteilten Messwerten wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Zur Interpretation der Effektstärke wurden die Richtlinien nach Cohen (1998) verwendet (Tabelle 32) [34]. Auf eine Korrektur für multiples Testen wurde explizit verzichtet, da diese Analysen keinen konfirmatorischen Charakter haben sollten, sondern der Hypothesengenerierung dienen.

Tabelle 23: Korrelation nach Cohen

Richtlinien zur Interpretation der Effektstärke r nach Cohen (1998)	
Schwache Korrelation	$r = \pm 0,1$
Moderate Korrelation	$r = \pm 0,3$
Starke Korrelation	$r = \pm 0,5$

Um Daten zwischen nur zwei Gruppen zu vergleichen, wurde bei unabhängigen Stichproben und parametrischen Daten der t-Test, und bei nichtparametrischen Daten der Mann-Whitney-

U-Test, verwendet. Für das Verfassen dieser Dissertation, die statistischen Berechnungen, Tabellen und Abbildungen wurden SPSS v18.0 der Firma IBM (New York, USA), Excel (Office365) und Word (Office365) der Firma Microsoft (New Mexico, USA) sowie BioRender (Ontario, Canada) verwendet.

6 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in vier Teile gegliedert. Im ersten Teil werden die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung im Mausmodell dargestellt. Der zweite Teil behandelt die Quantifizierung der microRNA-Expressionsprofile im Mausmodell. Im dritten Teil werden microRNA-Expressionsprofile in humanen Serumproben von Patienten mit Leberzirrhose, Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller Infektion sowie gesunden Probanden beschrieben. Der vierte und letzte Teil der Ergebnisse beschreibt die Validierung einer geeigneten microRNA (*hsa-mir-148a-3p*) in einer Kohorte von Patienten mit nach EASL-CLIF Definition bestätigtem ACLF.

6.1 Einführung zu den Ergebnissen im Mausmodell

Durch den Vergleich der vier Gruppen des Mausmodells (Tabelle 24) lassen sich Rückschlüsse darauf ziehen, welche Veränderungen im Organismus allein durch die zweistufige Pathophysiologie des ACLF, bestehend aus chronischer (*Abcb4*-Defizienz) und akuter Leberschädigung (intraperitoneale LPS-Injektion), hervorgerufen werden. Diese zweistufige Pathophysiologie ist einzig bei den ACLF-Mäusen (*Abcb4*-Defizienz + LPS) gegeben, wohingegen die anderen Tiere nur singular eine chronische Leberschädigung (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) oder akute Leberschädigung (WT + LPS) modellieren. Folglich sind, um die spezielle Pathophysiologie des ACLF zu analysieren, vor allem Veränderungen interessant, welche nur bei den ACLF-Mäusen (*Abcb4*-Defizienz + LPS), nicht aber in den anderen Gruppen, zu beobachten sind.

Tabelle 24: Ätiologie der Leberschädigung im Mausmodell

Injektionslösung/Mausstamm	<i>C57BL/6J</i> -Wildtyp	<i>Abcb4</i> -Defizienz
Kontrolle (NaCl 0,9%)	WT + NaCl (Kontrollgruppe)	<i>Abcb4</i> -Defizienz + NaCl (chronischer Leberschaden)
LPS-Injektion	WT + LPS (akuter Leberschaden)	<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS (ACLF)

6.2 mRNA-Sequenzierung im Mausmodell

6.2.1 Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung

Eine gängige Methode, um sich den umfangreichen Ergebnissen der RNA-Sequenzierung zu nähern, ist es die Daten einer sogenannten Hauptkomponentenanalyse [engl. Principal component analysis (PCA)] zu unterziehen. In die Hauptkomponentenanalyse geht für jedes Tier

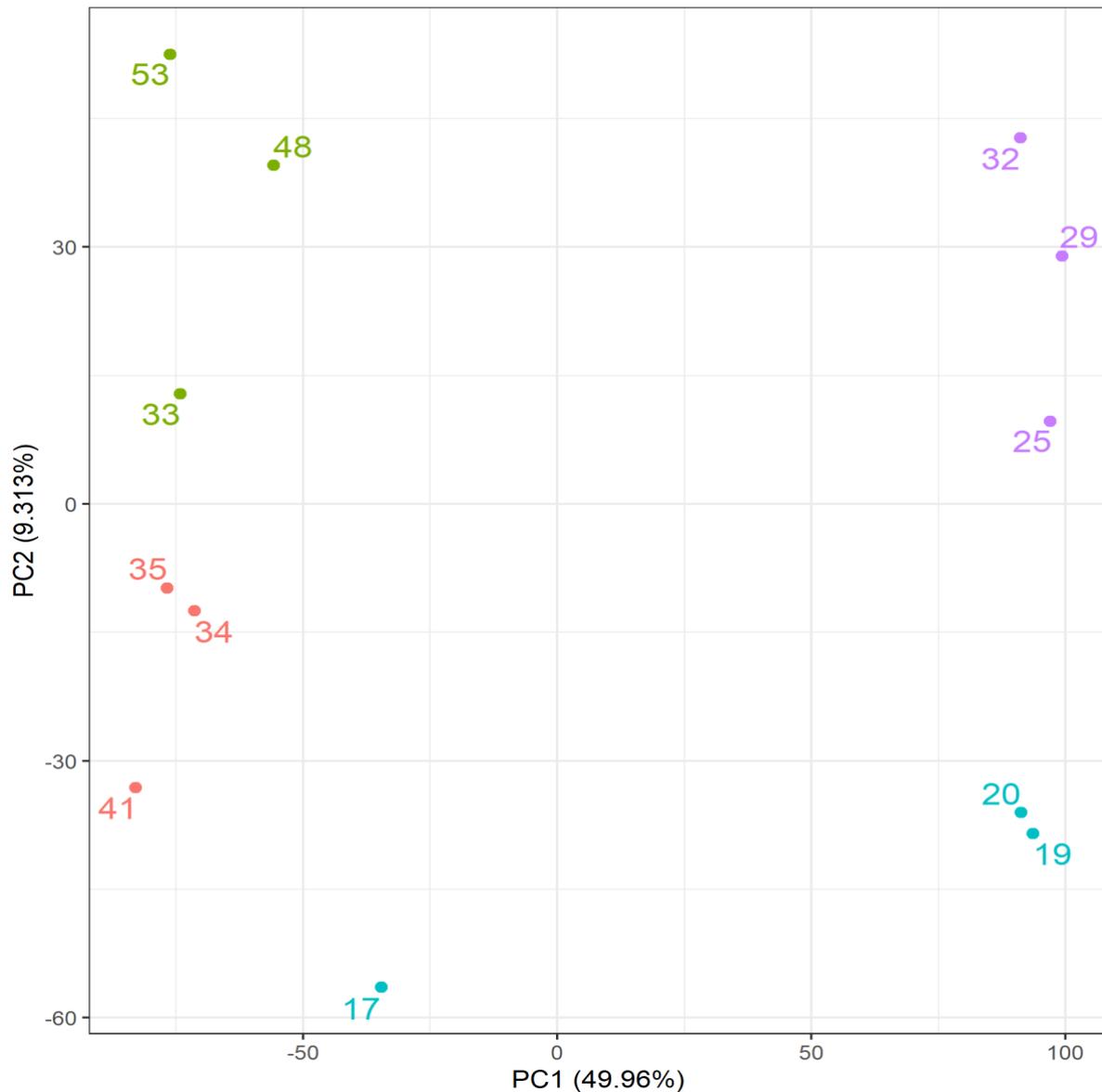
ein Datensatz tausender transkribierter Gene aus der mRNA-Sequenzierung ein und wird jeweils auf einen einzigen Datenpunkt komprimiert. Hierdurch ist es möglich einen Datensatz mit tausenden Dimensionen in einem zweidimensionalen Graph darzustellen. Die mit den Tieren des Mausmodells korrespondierenden Datenpunkte sind in Tabelle 25 aufgelistet.

Tabelle 25: Mit den Gruppen des Mausmodells korrespondierende Datenpunkte der Hauptkomponentenanalyse

Kontrollgruppe (WT + NaCl)	35, 34, 41
Chronischer Leberschaden (<i>Abcb4</i> -Defizienz + NaCl)	33, 53, 48
Akuter Leberschaden (WT + LPS)	17, 19, 20
Akut-auf-chronischer Leberschaden (<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS)	25, 29, 32

Zwei wichtige Kennwerte der Hauptkomponentenanalyse sind die erste Hauptkomponente PC1 (engl. first principal component) und die zweite Hauptkomponenten PC2 (engl. second principal component). Die erste Hauptkomponente ist die größte Ausdehnung im Raum und entspricht somit auch der größten Varianz zwischen den Datenpunkten. Die zweite Hauptkomponente verläuft orthogonal zur ersten und entspricht der zweitgrößten Varianz. In der endgültigen Darstellung (Abbildung 13) sind die Daten so angeordnet, dass die erste Hauptkomponente die X-Achse und die zweite Hauptkomponente die Y-Achse darstellt. Den Datenpunkten der jeweiligen Proben wird je nach ihrem Einfluss auf die beiden Hauptkomponenten ein Platz im Koordinatensystem zugewiesen. Proben mit ähnlichen Expressionsprofilen liegen nun räumlich nah beieinander und je weiter zwei Proben voneinander entfernt dargestellt sind, desto größer sind die Unterschiede zwischen ihren Expressionsprofilen [18,118,139].

Abbildung 13: Score-Plot der Hauptkomponentenanalyse der mRNA-Sequenzierung an Lebergewebe von jeweils drei Tieren aus jeder Gruppe des Mausmodells



Orange = Kontrollgruppe (WT + NaCl), Grün = Chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz), Türkis = Akuter Leberschaden (WT + LPS) und Lila = Akut-auf-chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS)

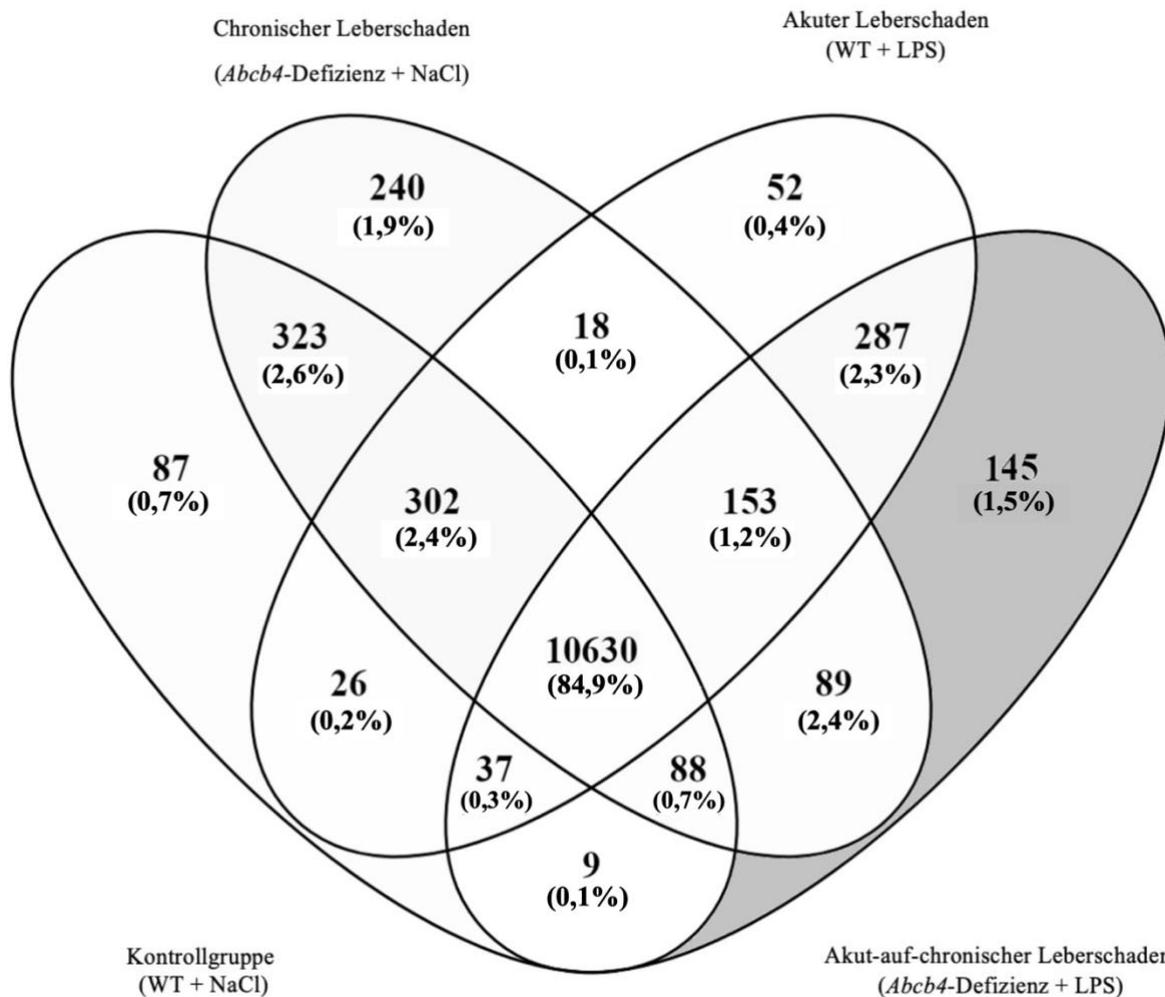
Die erste Hauptkomponente PC1 erfasst nahezu die Hälfte der Varianz aller Daten (49,96%) und die zweite Hauptkomponenten schließt weitere 9,31% der Daten ein. Folglich sind in dieser zweidimensionalen Abbildung 59,27 % der Varianz des gesamten Datensatzes erfasst worden. Bei gleicher Distanz ist der Unterschied der Expressionsprofile zwischen zwei Proben auf der X-Achse (erste Hauptkomponente: 49,96% der Varianz) größer als auf der Y-Achse (zweite Hauptkomponente: 9,31% der Varianz).

Die Proben jeder der vier Gruppen des Mausmodells bilden eindeutige Cluster in der Hauptkomponentenanalyse. Hieraus lässt sich folgern, dass die mRNA-Expressionsprofile innerhalb einer Gruppe ähnlich sind und sich zwischen den verschiedenen Gruppen deutlich unterscheiden. Insbesondere auf der X-Achse (erste Hauptkomponente) liegen die Datenpunkte der zu einer Gruppe gehörenden Proben dicht aneinander, was für eine geringe Varianz spricht. Lediglich Probe 17 aus der Gruppe akuter Leberschaden (WT + LPS) liegt weiter entfernt von den anderen Proben derselben Gruppe.

6.2.2 Differentially expressed Genes (DEGs)

Um die genetischen Hintergründe des ACLF besser verstehen und einordnen zu können, eignet sich die Untersuchung von differentiell exprimierten Genen [Differentially expressed Genes (DEGs)]. Hierzu wurden die mRNA-Expressionsprofile der vier Gruppen gegenübergestellt, und es wurden die Gene identifiziert, deren Expression sich zwischen den jeweiligen Gruppen signifikant unterscheidet. Mithilfe dieser DEGs lassen sich die genotypischen Besonderheiten des ACLF (*Abcb4*-Defizienz + LPS) im Vergleich zu den drei differenziellen Kontrollgruppen (WT + NaCl, *Abcb4*-Defizienz + NaCl und WT + LPS) herausarbeiten und es sind Rückschlüsse auf zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismen möglich [108,110]. Die DEGs der mRNA-Sequenzierung des Mausmodells sind in Abbildung 14 in einem Venn-Diagramm dargestellt. Für diese Untersuchung wurde die Genexpression jeder einzelnen Gruppe, mit der der drei anderen Gruppen verglichen [z.B. Kontrollgruppe (WT + NaCl) vs. chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl), Kontrollgruppe (WT + NaCl) vs. akuter Leberschaden (WT + LPS) und Kontrollgruppe (WT + NaCl) vs. akut-auf-chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) etc.], so dass insgesamt zwölf paarweise Vergleiche in dieses Diagramm einfließen.

Abbildung 14: Differentially expressed Genes im Venn-Diagramm



Die Zahl 145 (grau schattiert) zeigt die Anzahl der Differentially expressed Genes, welche ausschließlich in der Gruppe mit Akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) exprimiert werden.

Es wurde die Expression von insgesamt 12 486 Genen untersucht, wovon 10 630 (84,9%) zwischen den vier Gruppen gleichmäßig exprimiert wurden. Es gab 145 Gene (grau schattiert) welche nur in der Gruppe der Versuchstiere mit Akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) verändert exprimiert wurden (engl. „Exclusively expressed Genes“). Zudem fällt auf, dass die Versuchstiere mit akutem Leberschaden (WT + LPS) die meisten (DEGs) (287 oder 2,3%) mit den Versuchstieren mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) teilen. Weniger Überschneidungen gab es zwischen den Versuchstieren mit chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) und denen mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) (153 oder 1,2%). Am wenigsten gemeinsame DEGs mit den Versuchstieren aus der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) hatten die Versuchstiere der Kontrollgruppe (WT + NaCl) (9 oder 0,1%). Die 145 Gene, welche nur bei den Versuchstieren mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-

Defizienz + LPS) exprimiert wurden, scheinen die spezielle Pathophysiologie des ACLF am besten zu erfassen, weshalb sie Grundlage für weitere Analysen sein sollen.

6.2.3 Induzierte Gene in den ACLF-Mäusen

Von den 145 identifizierten DEGs, welche nur bei den Versuchstieren mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) exprimiert wurden, waren 127 hochreguliert (Tabelle 26).

Tabelle 26: Hochregulierte Differentially expressed Genes in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS)

Nummer	Name des Genes	Ensemble Gene ID	P-Wert
1	Fcgr1	ENSMUSG00000015947	2,17E-11
2	Cd86	ENSMUSG00000022901	2,24E-07
3	Cyth4	ENSMUSG00000018008	2,87E-07
4	Rgs2	ENSMUSG00000026360	1,64E-06
5	Slc1a1	ENSMUSG00000024935	1,64E-06
6	Rcc1	ENSMUSG00000028896	2,54E-06
7	Pycard	ENSMUSG00000030793	7,24E-06
8	Adora2b	ENSMUSG00000018500	7,95E-06
9	Sumo1	ENSMUSG00000026021	7,95E-06
10	Lrrc8c	ENSMUSG00000054720	1,65E-05
11	Csrp1	ENSMUSG00000026421	2,20E-05
12	Fabp7	ENSMUSG00000019874	2,20E-05
13	Fxyd6	ENSMUSG00000066705	3,07E-05
14	Ccng2	ENSMUSG00000029385	3,71E-05
15	Hk3	ENSMUSG00000025877	4,16E-05
16	Milr1	ENSMUSG00000040528	4,82E-05
17	Ccl22	ENSMUSG00000031779	7,00E-05
18	Syk	ENSMUSG00000021457	7,00E-05
19	Ralgds	ENSMUSG00000026821	7,16E-05
20	Scimp	ENSMUSG00000057135	7,31E-05
21	Spi1	ENSMUSG00000002111	7,31E-05
22	Lmo4	ENSMUSG00000028266	7,99E-05
23	Hck	ENSMUSG00000003283	8,52E-05
24	Slc6a8	ENSMUSG00000019558	8,90E-05

25	Ctla2b	ENSMUSG00000074874	8,98E-05
26	Adh7	ENSMUSG00000055301	0,000107785
27	Abcc5	ENSMUSG00000022822	0,000124199
28	Fam49a	ENSMUSG00000020589	0,000124199
29	Cd53	ENSMUSG00000040747	0,000125039
30	Cpeb2	ENSMUSG00000039782	0,000141086
31	Tnip3	ENSMUSG00000044162	0,00014598
32	Ccr7	ENSMUSG00000037944	0,000153815
33	Fcgr4	ENSMUSG00000059089	0,000208971
34	Ackr1	ENSMUSG00000037872	0,000217918
35	Btc	ENSMUSG00000082361	0,000258986
36	Spink1	ENSMUSG00000024503	0,000275899
37	Parp8	ENSMUSG00000021725	0,000298599
38	Mrgpra2b	ENSMUSG00000096719	0,000299112
39	Unc79	ENSMUSG00000021198	0,000326347
40	Itk	ENSMUSG00000020395	0,000399363
41	Tlr7	ENSMUSG00000044583	0,000402926
42	Tlr3	ENSMUSG00000031639	0,000473785
43	Slc15a3	ENSMUSG00000024737	0,000496684
44	Arl13b	ENSMUSG00000022911	0,000516218
45	Jade1	ENSMUSG00000025764	0,000546598
46	Marcks11	ENSMUSG00000047945	0,000546976
47	Tmem106a	ENSMUSG00000034947	0,000571806
48	Fmnl2	ENSMUSG00000036053	0,000576869
49	Fscn1	ENSMUSG00000029581	0,00065064
50	Gm6377	ENSMUSG00000048621	0,000654913
51	Ptafr	ENSMUSG00000056529	0,000654913
52	Ifi209	ENSMUSG00000043263	0,000656117
53	Numbl	ENSMUSG00000063160	0,000656117
54	Slc28a2	ENSMUSG00000027219	0,000761129
55	Cxcl16	ENSMUSG00000018920	0,000772687
56	Duoxa2	ENSMUSG00000027225	0,000823013
57	Rubcnl	ENSMUSG00000034959	0,000823013
58	Dse	ENSMUSG00000039497	0,000934829
59	Napsa	ENSMUSG00000002204	0,001019364
60	Neur13	ENSMUSG00000047180	0,001028214

61	Fgr	ENSMUSG00000028874	0,001074832
62	Ly9	ENSMUSG00000004707	0,001095448
63	Hcls1	ENSMUSG00000022831	0,00120052
64	Ms4a6b	ENSMUSG00000024677	0,001229941
65	Cd244a	ENSMUSG00000004709	0,001239225
66	Plek	ENSMUSG00000020120	0,001261225
67	Cd48	ENSMUSG00000015355	0,001262823
68	Mxd1	ENSMUSG00000001156	0,001284528
69	Edn1	ENSMUSG00000021367	0,001345631
70	Elf3	ENSMUSG00000003051	0,001728223
71	Spib	ENSMUSG00000008193	0,001872882
72	Tnip1	ENSMUSG00000020400	0,001982666
73	Sptlc2	ENSMUSG00000021036	0,002235143
74	Gpr35	ENSMUSG00000026271	0,002296152
75	Ypel4	ENSMUSG00000034059	0,002375594
76	Fpr2	ENSMUSG00000052270	0,002404336
77	Il1a	ENSMUSG00000027399	0,002600777
78	Cd80	ENSMUSG00000075122	0,002665614
79	Cd44	ENSMUSG00000005087	0,002802633
80	Slc51b	ENSMUSG00000053862	0,003034825
81	Plac8	ENSMUSG00000029322	0,003115044
82	Sp100	ENSMUSG00000026222	0,003117193
83	Casp4	ENSMUSG00000033538	0,003349549
84	Abra	ENSMUSG00000042895	0,00376232
85	Mmp7	ENSMUSG00000018623	0,003884073
86	Parp14	ENSMUSG00000034422	0,004115608
87	Asprv1	ENSMUSG00000033508	0,004208508
88	Abcb1b	ENSMUSG00000028970	0,004667102
89	Pla2g4a	ENSMUSG00000056220	0,00469751
90	Tfec	ENSMUSG00000029553	0,005123784
91	Dusp2	ENSMUSG00000027368	0,005308908
92	Il27	ENSMUSG00000044701	0,007928976
93	Cd33	ENSMUSG00000004609	0,008456304
94	Relt	ENSMUSG00000008318	0,008456304
95	Rgs1	ENSMUSG00000026358	0,010764359
96	Ccr1	ENSMUSG00000025804	0,010861374

97	Spic	ENSMUSG00000004359	0,011560731
98	Il22	ENSMUSG00000074695	0,012786434
99	Gm11827	ENSMUSG00000086765	0,013660576
100	Meg3	ENSMUSG00000021268	0,019576484
101	Ccl5	ENSMUSG00000035042	0,021243185
102	Slc12a8	ENSMUSG00000035506	0,022086616
103	Cd69	ENSMUSG00000030156	0,023873223
104	Slamf7	ENSMUSG00000038179	0,024358666
105	Nat14	ENSMUSG00000035285	0,024756504
106	Clec4d	ENSMUSG00000030144	0,024921866
107	Ifi205	ENSMUSG00000054203	0,025701369
108	Slc7a11	ENSMUSG00000027737	0,025964967
109	Trp63	ENSMUSG00000022510	0,026265653
110	Cd83	ENSMUSG00000015396	0,026268041
111	Il2	ENSMUSG00000027720	0,026269113
112	Lrrc63	ENSMUSG00000021997	0,027425918
113	Coro2a	ENSMUSG00000028337	0,02943071
114	Ifitm6	ENSMUSG00000059108	0,030946924
115	Ms4a8a	ENSMUSG00000024730	0,031876605
116	Tpx2	ENSMUSG00000027469	0,038324198
117	Arg2	ENSMUSG00000021125	0,038538192
118	Tagap	ENSMUSG00000033450	0,048145929
119	Camp	ENSMUSG00000038357	0,048616958
120	Tnfsf9	ENSMUSG00000035678	0,049063303
121	Ptgs2	ENSMUSG00000032487	0,052743366
122	Ccl4	ENSMUSG00000018930	0,05681557
123	Il6	ENSMUSG00000025746	0,063703164
124	Mcoln2	ENSMUSG00000011008	0,06765616
125	Il10	ENSMUSG00000016529	0,07091268
126	Npy	ENSMUSG00000029819	0,083846743

6.2.4 Reprimierte Gene in den ACLF-Mäusen

Hingegen waren 18 der 145 identifizierten DEGs bei den Versuchstieren mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) herunterreguliert (Tabelle 27).

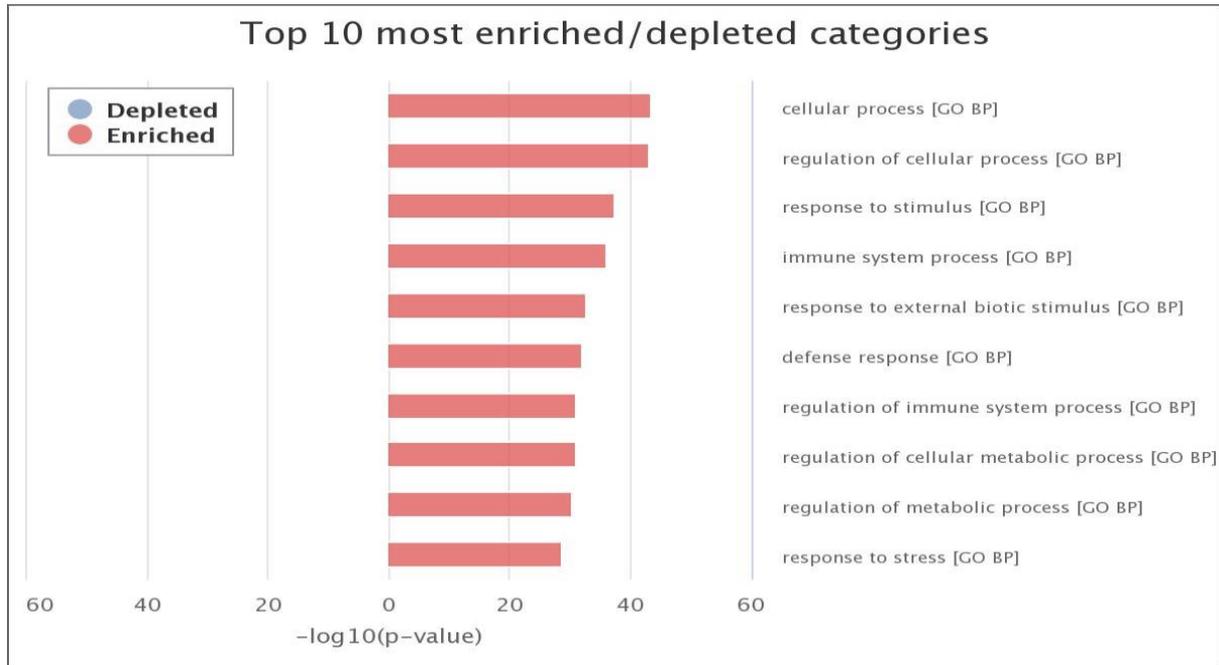
Tabelle 27: Herunterregulierte Differentially expressed Genes der Versuchstiere mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS)

Nummer	Name des Genes	Ensemble Gene ID	P-Wert
1	Hykk	ENSMUSG00000035878	1,39E-06
2	Kif13a	ENSMUSG00000021375	2,20E-05
3	Mn1	ENSMUSG00000070576	2,20E-05
4	Elovl3	ENSMUSG00000038754	5,29E-05
5	Rdh11	ENSMUSG00000066441	7,00E-05
6	Igfbp5	ENSMUSG00000026185	0,000125039
7	Shpk	ENSMUSG00000005951	0,00013001
8	Slc13a2	ENSMUSG00000001095	0,00014598
9	Zfp395	ENSMUSG00000034522	0,000146917
10	Cyp8b1	ENSMUSG00000050445	0,000151484
11	Gemin4	ENSMUSG00000049396	0,000154864
12	Mid1ip1	ENSMUSG00000008035	0,000223742
13	Slc25a45	ENSMUSG00000024818	0,000250942
14	As3mt	ENSMUSG00000003559	0,000258986
15	Ide	ENSMUSG00000056999	0,000355484
16	Smo	ENSMUSG00000001761	0,000371624
17	Paqr9	ENSMUSG00000064225	0,000391915
18	Eepd1	ENSMUSG00000036611	0,000681391

6.2.5 Gene Ontology-Anreicherungsanalysen [Gene Ontology (GO) term enrichment]

Die 145 DEGs, welche nur bei den Versuchstieren mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) exprimiert werden, scheinen die genetische Grundlage für die deregulierten biologischen Prozesse des ACLF zu bilden. Um diese biologischen Prozesse zu demaskieren, wurden Gene-Ontology Anreicherungsanalysen mittels GeneTrail 3.0 mit der Teildatenbank biologische Prozesse (GO - Biological Process) als Datenbank und den 145 DEGs als Ausgangsdaten durchgeführt [55].

**Abbildung 15: Am stärksten angereicherte Kategorien der Gene Ontology-
Anreicherungsanalysen biologischer Prozesse mit GeneTrail**



Die Gene-Ontology Anreicherungsanalysen der biologischen Prozesse ergaben für die 145 DEGs die in Abbildung 15 und Tabelle 28 dargestellten Ergebnisse.

Tabelle 28: Ergebnisse der Gene-Ontology Anreicherungsanalyse der biologische Prozesse

Rang	Biologischer Prozess	Anzahl der beteiligten Gene	q-Wert
1	Zelluläre Prozesse	110/145	3.62E-44
2	Regulation zellulärer Prozesse	99/145	4.49E-44
3	Reaktion auf Stimulus	72/145	3.65E-38
4	Prozess des Immunsystems	48/145	6.44E-37
5	Reaktion auf externen biotischen Stimulus	41/145	1.34E-33
6	Abwehrreaktion	39/145	1.02E-32
7	Regulation von Prozessen des Immunsystems	41/145	1.10E-31
8	Regulation zellulärer Stoffwechselprozesse	65/145	1.10E-31
9	Regulation von Stoffwechselprozessen	67/145	3.54E-31
10	Stressreaktion	49/145	2.10E-29

6.2.6 KEGG-Pfadanalyse [KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Pathway]

Um die molekularen Interaktionen und Signalwege, welche hinter den 145 DEGs stehen, zu identifizieren, wurde eine KEGG-Pfadanalyse mittels GeneTrail 3.0 durchgeführt. Die Ergebnisse der KEGG-Pfadanalyse sind in Abbildung 16 und Tabelle 29 dargestellt [55].

Abbildung 16: Am stärksten angereicherte Kategorien der KEGG-Pfadanalyse mit GeneTrail

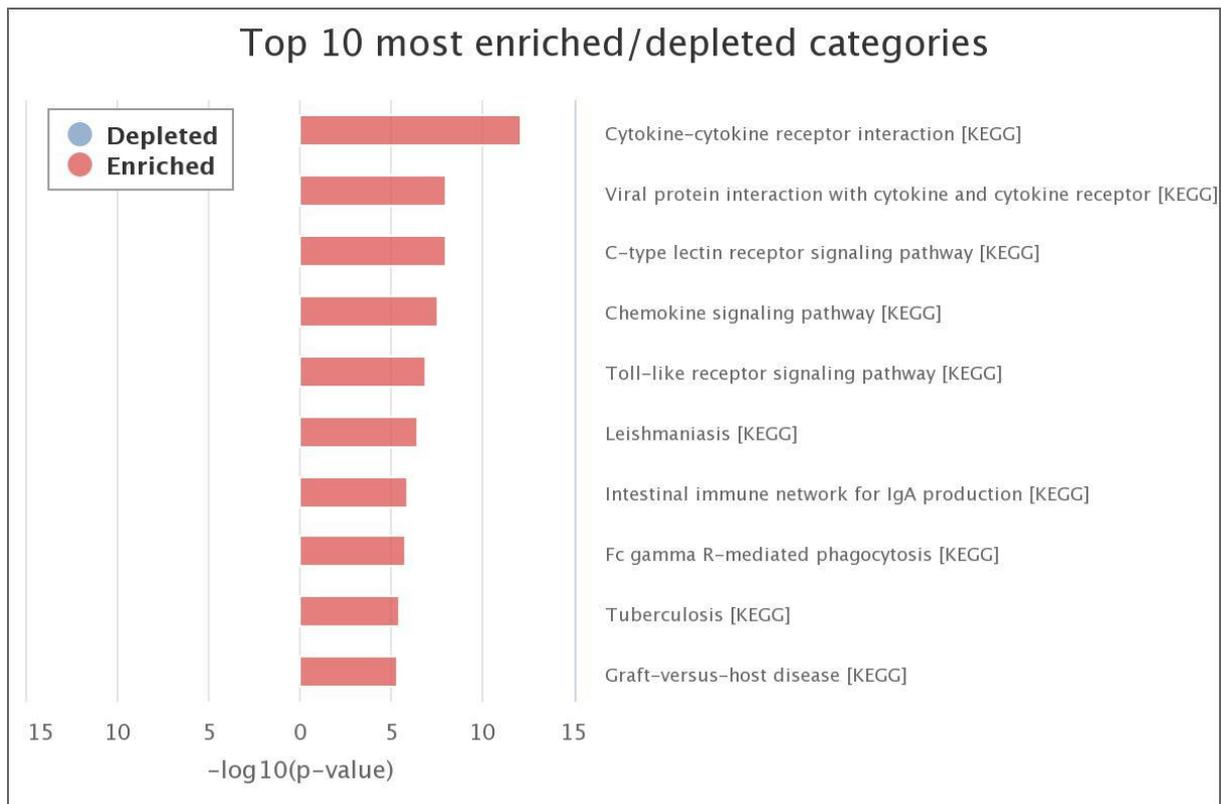


Tabelle 29: Ergebnisse der KEGG-Pfadanalyse

Rang	Signalpfad	Beteiligte Gene	q-Wert
1	Wechselwirkung zwischen Zytokinen und Zytokinrezeptoren	14/145	8.09E-13
2	Interaktion von viralen Proteinen mit Zytokinen und Zytokinrezeptoren	8/145	9.35E-9
3	C-Typ-Lektin-Rezeptor-Signalweg	8/145	9.91E-9
4	Chemokin-Signalweg	8/145	2.93E-8
5	Toll-like-Rezeptor-Signalweg	7/145	1.34E-7
6	Leishmaniose	6/145	3.41E-7
7	Intestinales Immunnetzwerk für die IgA-Produktion	5/145	1.25E-6
8	Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose	6/145	1.62E-6

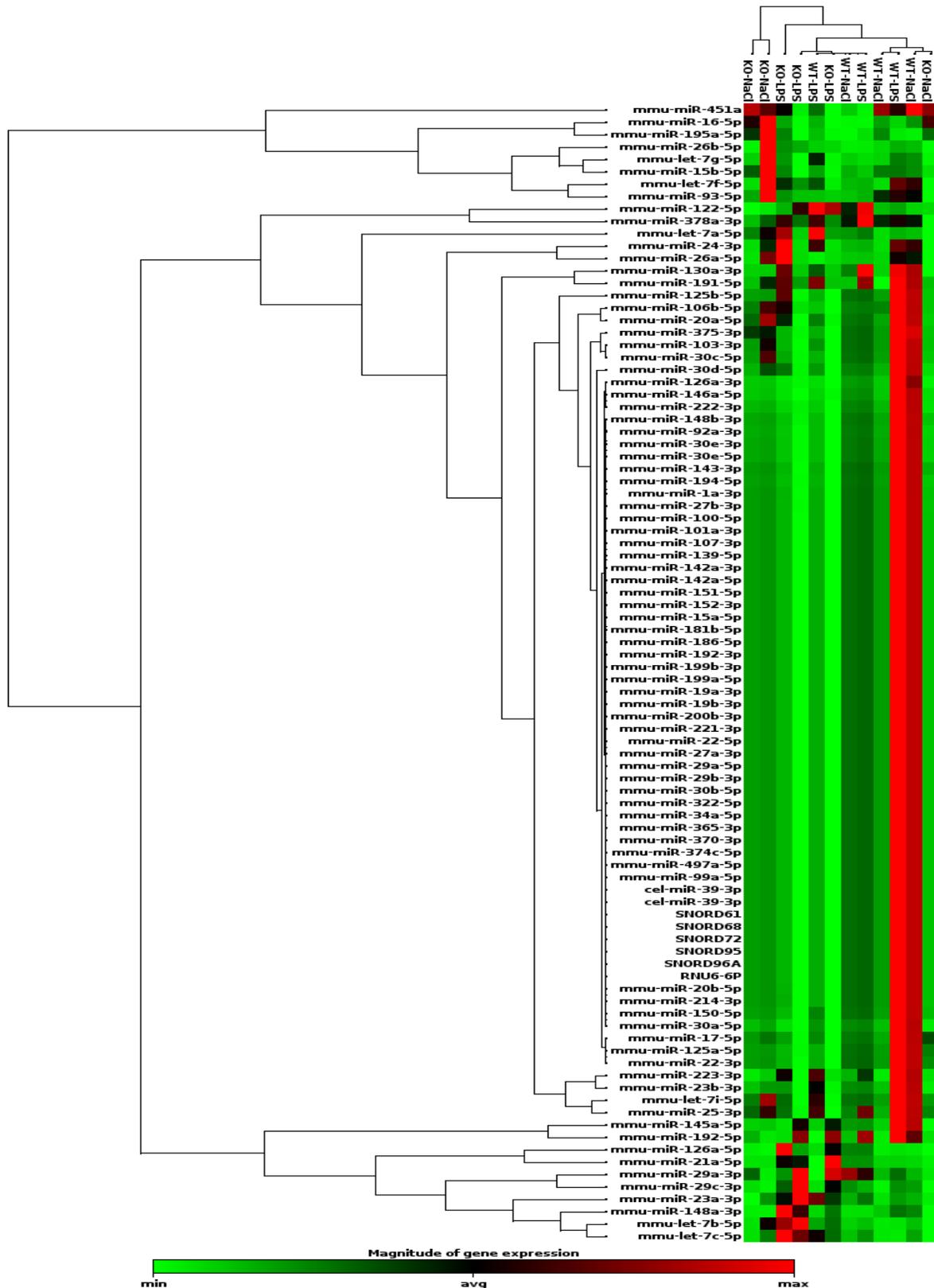
9	Tuberkulose	7/145	3.59E-6
10	Graft-versus-Host-Krankheit	5/145	4.53E-6

6.3 microRNA-Expressionsprofile im Mausmodell

Nachdem die C_t -Werte der PCR in das webbasierte GeneGlobe Data Analysis Center eingefügt wurden stehen dem Anwender verschiedene Auswertungsmöglichkeiten zur Verfügung. Nach Rücksprache mit der Firma Qiagen wurden die Daten mit der Methode „Global CT Mean of expressed microRNAs“ normalisiert. Die Gruppe der *C57BL/6J*-Wildtyp-Mäuse mit NaCl 0,9% Injektion wurde als Kontrollgruppe definiert. Dann wurden die Daten über die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet und als Fold-Change dargestellt. Es wurde der t-Test zwischen der Kontrollgruppe und der jeweils betrachteten Interventionsgruppe (1/2/3) angewandt und ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ festgelegt. Der Fold-Change stellt die Ergebnisse anschaulich als relative Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe dar. Fold-Change-Werte über 1,0 beschreiben eine vermehrte Expression der jeweiligen microRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe, wohingegen Fold-Change Werte unter 1,0 für eine verminderte Expression sprechen. Es wurde gezielt nach microRNAs gesucht, die in Gruppe 3 (akut-auf-chronische Leberschädigung) im Vergleich zu den anderen Gruppen veränderte Expressionsniveaus aufwiesen.

In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen der microRNA-Arrays als Heatmap dargestellt. Jede Zeile entspricht einer Probe und jede Spalte dem Expressionsniveau der jeweiligen microRNA. Grün steht für eine geringe Expression und Rot für eine hohe Expression. Die Versuchstiere mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) sind hier als KO-LPS dargestellt. Es fällt auf, dass die microRNAs, welche in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) im Vergleich zu den anderen Gruppen verändert exprimiert werden, vor allem induziert sind. Dies gilt beispielweise für *mmu-let-7c-5p*, *mmu-let7b-5p*, *mmu-mir148a-3p*, *mmu-mir-23a-3p*, *mmu-mir-29a-3p*, *mmu-mir29c-3p*, *mmu-mir-21a-5p* und *mmu-mir-122-5p*. Folglich ist eine wichtige Erkenntnis aus dieser Heatmap, dass sich die weitere Suche vor allem auf microRNAs konzentrieren sollte, welche in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) hochreguliert sind. Diese Heatmap liefert jedoch nur einen ersten Überblick über die Ergebnisse und hilft Trends zu erkennen. In den folgenden Darstellungen (Volcano-Plots, Tabellen) werde die Ergebnisse insbesondere unter Berücksichtigung ihrer Signifikanz dargestellt.

Abbildung 17: Heatmap der Expression der 84 leberspezifischen microRNAs zwischen den vier Gruppen des Mausmodells

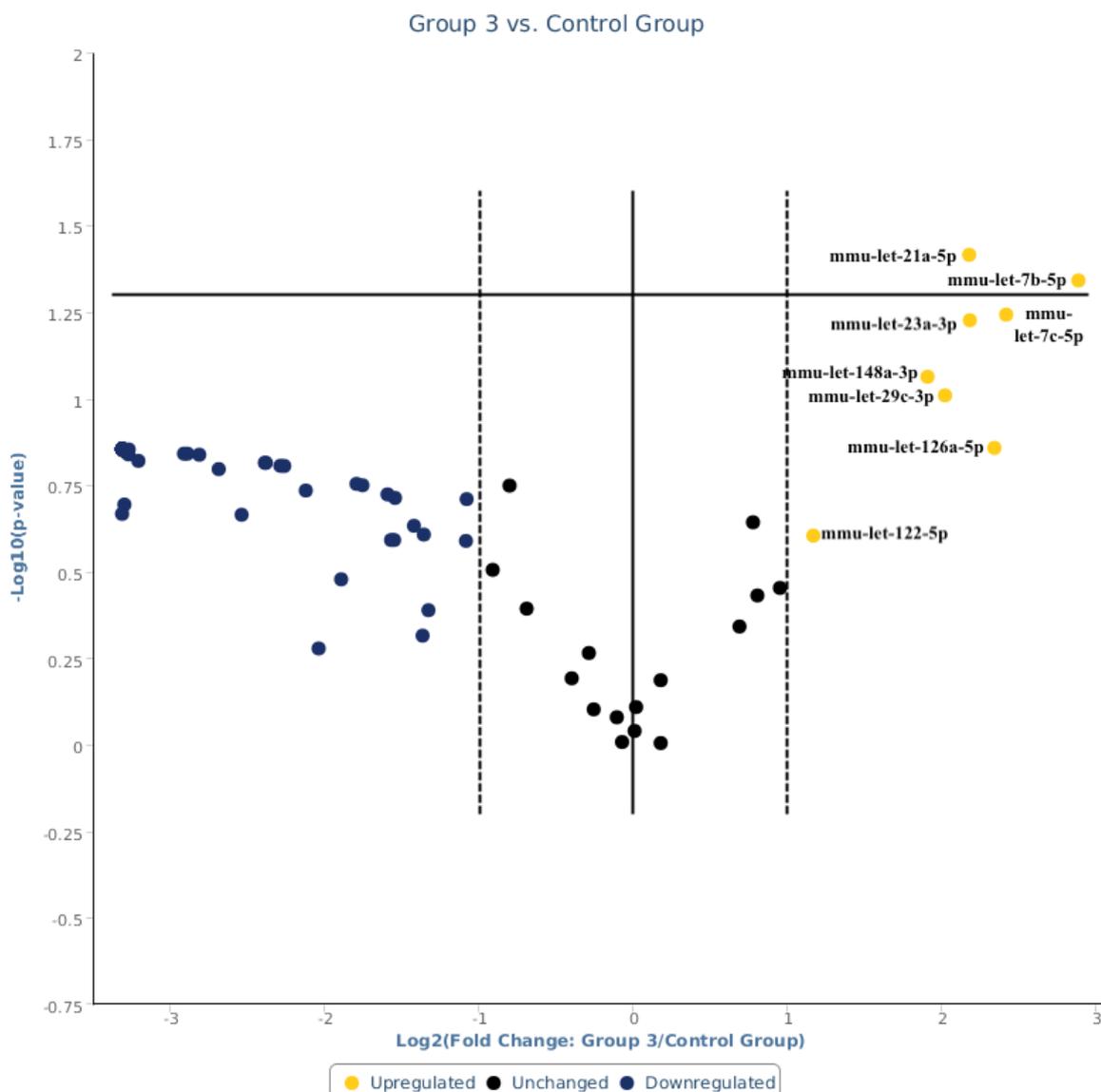


Kontrollgruppe (WT + NaCl) = WT-NaCl, chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) = KO-NaCl, akuter Leberschaden (WT + LPS) = WT-LPS und akut-auf-chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) = KO-LPS. Eine geringe Expression der microRNAs ist grün und eine erhöhte Expression ist rot dargestellt.

6.3.1 Volcano-Plots

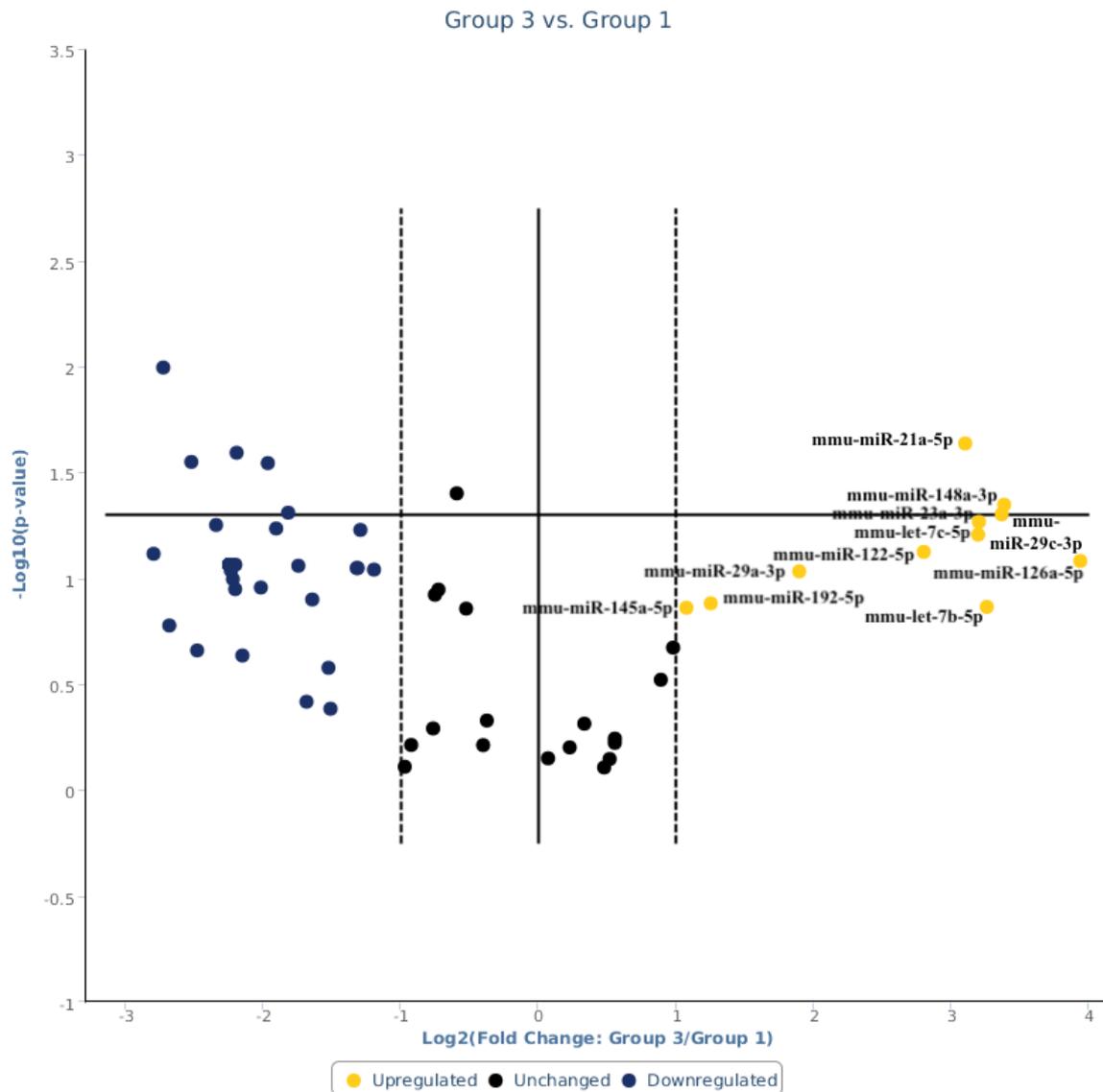
Im Folgendem sind die Ergebnisse der microRNA-Arrays als Volcano Plots (Abbildung 18 - 20) dargestellt. Volcano-Plots stellen das Verhältnis von statistischer Signifikanz (p-Wert) und der veränderten microRNA-Expression (Fold change) dar. Somit werden microRNAs mit hoher Signifikanz und hohem Fold change besonders hervorgehoben. Die statistische Signifikanz (t-Test) ist auf der y-Achse und der Fold-Change auf der x-Achse dargestellt. Jeder Punkt entspricht einer microRNA.

Abbildung 18: Volcano-Plot (*Abcb4*-Defizienz + LPS vs. WT + NaCl)



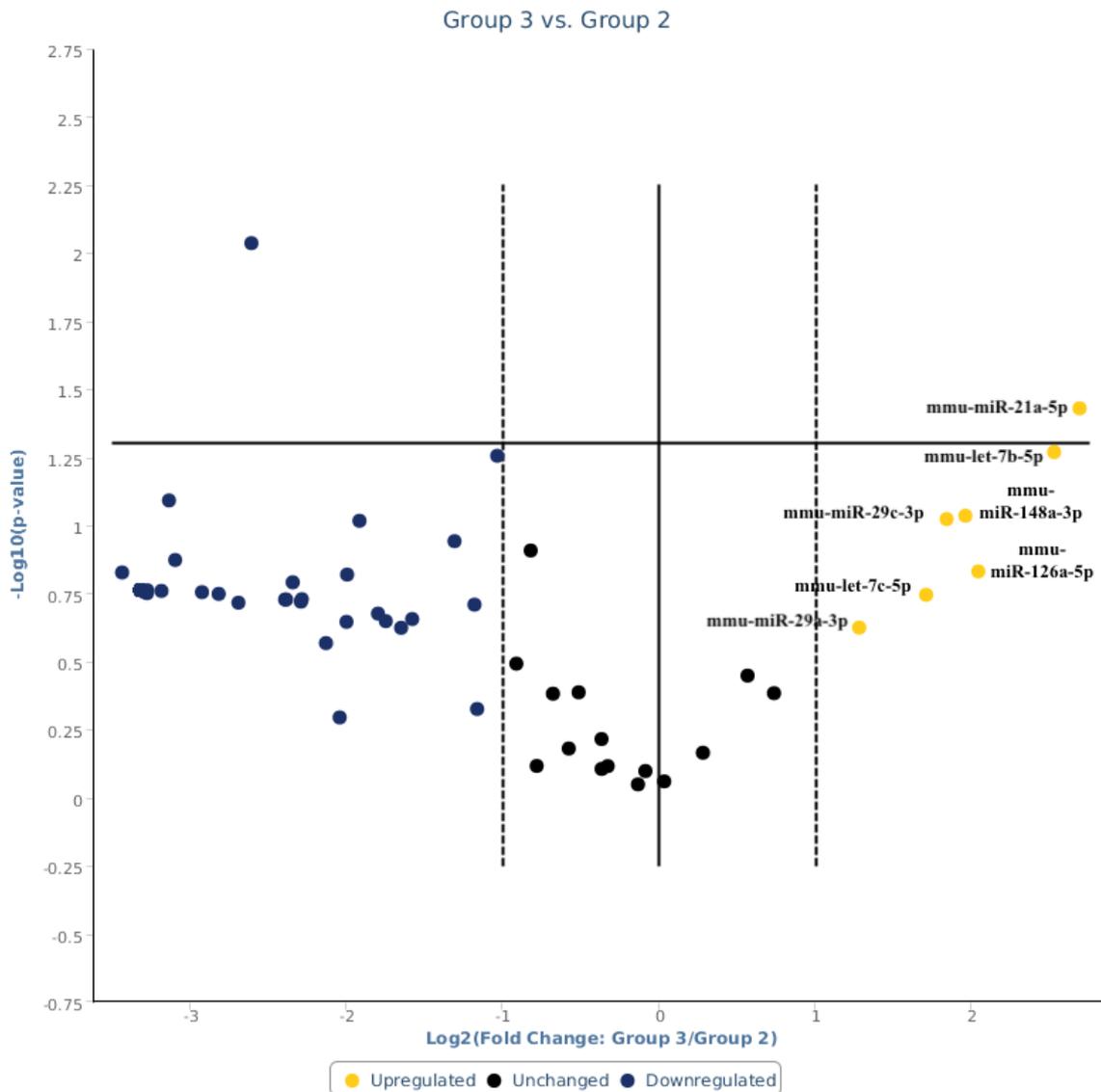
Vergleich der microRNA-Expressionsprofile zwischen der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) = Group 3 und der Kontrollgruppe (WT + NaCl) = Control Group, ausgewertet mit GeneGlobe Data Analysis Center der Firma Qiagen: t-Test und Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Abbildung 19: Volcano-Plot (*Abcb4*-Defizienz + LPS vs. *Abcb4*-Defizienz + NaCl)



Vergleich der microRNA-Expressionsprofile zwischen der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) = Group 3 und der Gruppe mit chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) = Group 1, ausgewertet mit GeneGlobe Data Analysis Center der Firma Qiagen: t-Test und Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Abbildung 20: Volcano-Plot (*Abcb4*-Defizienz + LPS vs. WT + LPS)



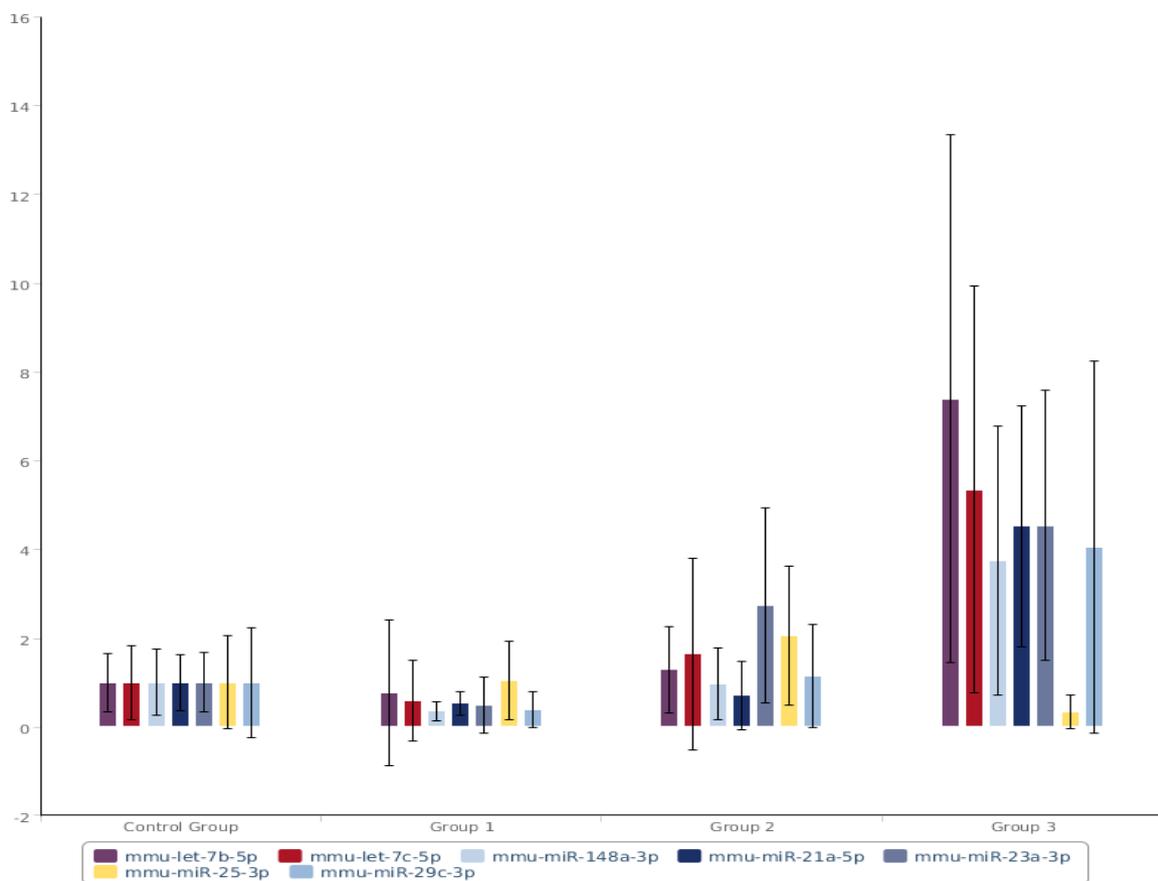
Vergleich der microRNA-Expressionsprofile zwischen der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) = Group 3 und der Gruppe mit akutem Leberschaden (WT + LPS) = Group 2, ausgewertet mit GeneGlobe Data Analysis Center der Firma Qiagen: t-Test und Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur microRNAs, welche in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) vermehrt exprimiert wurden, namentlich gekennzeichnet. Diese Art der Darstellung und Beschriftung wurde gewählt, weil die microRNAs, welche schlussendlich aufgrund ihrer Expression und der Signifikanz der Ergebnisse für weitere Untersuchungen in Betracht kamen, allesamt hochreguliert waren. Auf den Volcano-Plots in den Abbildungen 18 - 20 ist zu entnehmen, dass die microRNAs *mmu-let-7b-5p*, *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-148a-3p*, *mmu-miR-21a-5p* und *mmu-miR-29c-3p* in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) im Vergleich zu den

anderen drei Gruppen veränderte Expressionsprofile aufweisen. Teilweise erreichten diese Ergebnisse statistische Signifikanz und teilweise ergab sich ein statistischer Trend. Die microRNA *mmu-miR-23a-3p* ist in Interventionsgruppe 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe und zu Interventionsgruppe 1 hochreguliert. Insgesamt kamen also die sechs microRNAs für weitere Untersuchungen in Betracht.

6.3.2 Balkendiagramme

Abbildung 21: microRNA Expressionsprofile



Dargestellt sind die microRNA Expressionsprofile der Gruppe mit chronischem Leberschaden (*Abcb4-Defizienz* + NaCl) = Group 1, der Gruppe mit akutem Leberschaden (WT + LPS) = Group 2 und der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4-Defizienz* + LPS) = Group 3 als Fold-Change im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT + NaCl) = Control Group, ausgewertet mit GeneGlobe Data Analysis Center der Firma Qiagen: t-Test und Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Im Abbildung 21 sind die vorher, in den Volcano-Plots, identifizierten microRNAs *mmu-let-7b-5p*, *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-21a-5p*, *mmu-miR-23a-3p*, *mmu-miR-29c-3p* und *mmu-miR-148a-3p* als Balkendiagramme dargestellt. Zudem entschlossen wir uns, auch *mmu-miR-25-3p* für weitere Versuche zu berücksichtigen, da verminderte Serumspiegel von *mmu-miR-25-3p* bereits in der Literatur mit der Entwicklung eines ACLF und einer erhöhten 30-Tage Mortalität in Verbindung gebracht wurden [31]. Wie in Abbildung 21 zu sehen, ergaben sich auch in dieser

Arbeit verminderte Spiegel von *mmu-miR-25-3p* in der Gruppe mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS), auch wenn dieses Ergebnis keine statistische Signifikanz erreichte. Die beobachteten Veränderungen erreichten bei zwei microRNAs (*mmu-let-7b-5p* und *mmu-miR-21a-5p*) statistische Signifikanz, und bei vier weiteren (*mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-23a-3p*, *mmu-miR-29c-3p* und *mmu-miR-148a-3p*) ergab sich ein statistischer Trend. Die genauen Ergebnisse und ihre Signifikanz sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Fold-Change und p-Wert der microRNAs

microRNA	<i>Abcb4</i> -Defizienz + NaCl		WT + LPS		<i>Abcb4</i> -Defizienz + LPS	
	Fold-Change	p-Wert	Fold-Change	p-Wert	Fold-Change	p-Wert
<i>mmu-let-7b-5p</i>	0,7709	0,544953	1,2833	0,508133	7,3895	0,045566
<i>mmu-let-7c-5p</i>	0,5821	0,919483	1,636	0,376323	5,3403	0,057251
<i>mmu-miR-21a-5p</i>	0,5262	0,15476	0,7017	0,789063	4,5223	0,038424
<i>mmu-miR-23a-3p</i>	0,4925	0,620358	2,7281	0,176907	4,5366	0,05935
<i>mmu-miR-25-3p</i>	1,0523	0,881726	2,0522	0,223762	0,3363	0,256236
<i>mmu-miR-29c-3p</i>	0,3925	0,153759	1,1346	0,984047	4,0557	0,09787
<i>mmu-miR-148a-3p</i>	0,3584	0,100689	0,9651	0,979416	3,7497	0,086459

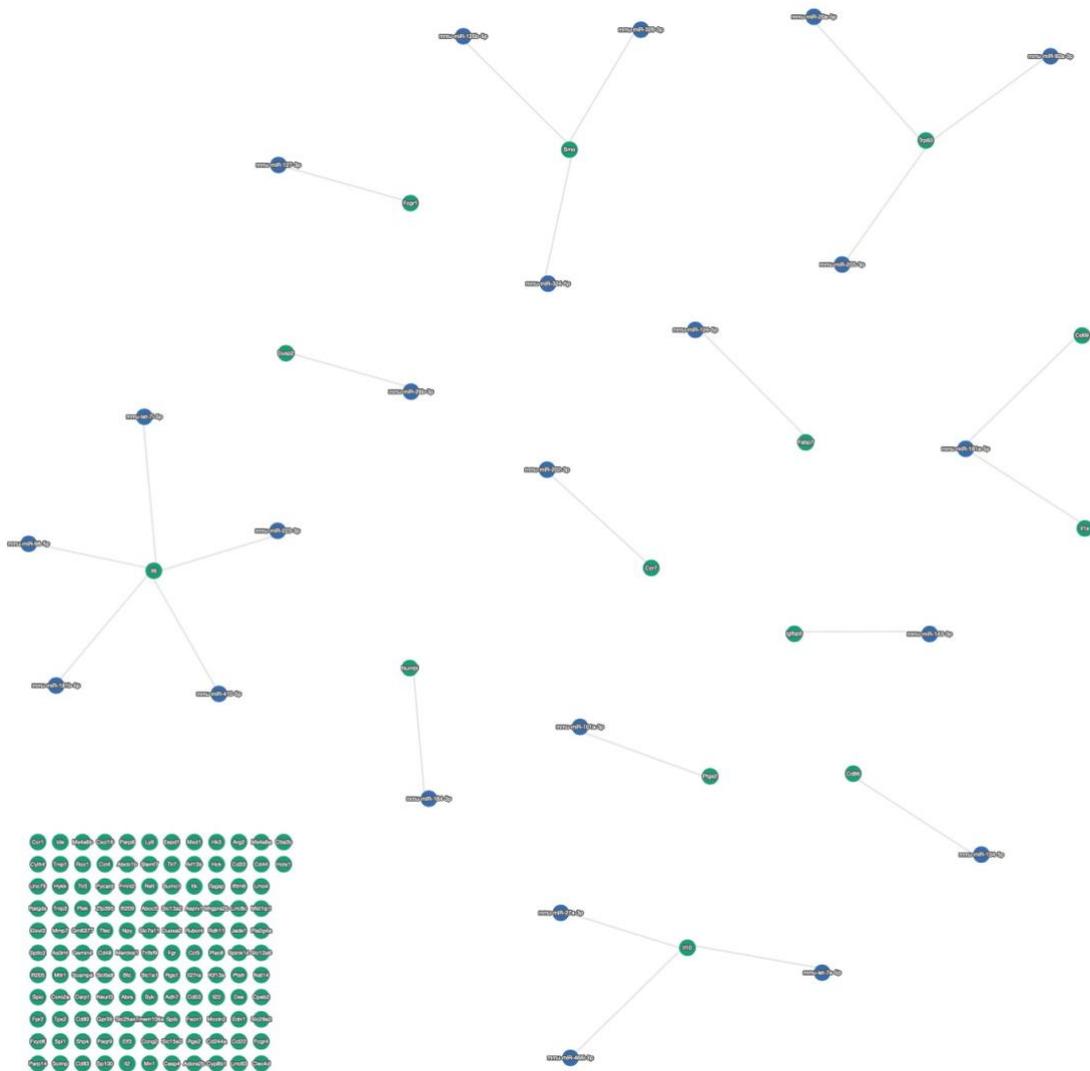
Dargestellt sind die Gruppen mit chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl), mit akutem Leberschaden (WT + LPS) und mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT + NaCl), ausgewertet mit GeneGlobe Data Analysis Center der Firma Qiagen: t-Test und Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Für die nicht signifikanten Ergebnisse gibt es zwei Deutungsmöglichkeiten: Die Erste ist, dass ein echter Unterschied besteht, jedoch die Stichprobengröße ($n = 3$) nicht zum Erreichen einer Signifikanz ausreichte. Die Zweite ist, dass ein zu kleiner Stichprobenumfang zu einem scheinbaren Effekt geführt hat, der sich bei einem ausreichend großen Stichprobenumfang als nicht signifikant erweist. Da es sich bei diesem Versuch um einen Vorversuch handelte und die Ergebnisse im Folgenden an großen Patientenkohorten validiert werden sollten, berücksichtigten wir in den Folgeexperimenten, in der Annahme, dass die Stichprobengröße ($n = 3$) zu klein gewählt war, um einen signifikanten Effekt zu zeigen, auch die microRNAs, welche das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ verfehlten. Zudem wurde *mmu-miR-25-3p* (Fold-Change: 0,3363, p-Wert: 0,2662), welche das Signifikanzniveau verfehlte, bereits im Zusammenhang mit akut-auf-chronischem Leberversagen beschrieben [31].

6.4 microRNA-mRNA-Interaktion

Um herauszufinden, ob die identifizierten microRNAs Einfluss auf die identifizierten DEGs haben, wurde das Webtool „miRTargetLink 2.0“ (siehe: <https://ccb-compute.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink2/>) verwendet [82]. In Abbildung 22 ist das Ergebnis als Interaktions-Graph dargestellt.

Abbildung 22: microRNA-mRNA Interaktions-Graph



Abgebildet ist ein microRNA-Zielgen-Netzwerk. Die 145 DEGs aus 6.2 wurde als Zielgene angegeben, und es wurden alle microRNAs, welche die DEGs regulieren, dargestellt.

Anschließend wurde dieses Netzwerk nach den sieben identifizierten microRNAs (*mmu-miR-21a-5p*, *mmu-let-7b-5p*, *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-23a-3p*, *mmu-miR-25-3p*, *mmu-miR-29c-3p* und *mmu-miR-148a-3p*) durchsucht. Diese Suche ergab keine Treffer, so dass davon auszugehen ist, dass es bis dato keine experimentell validierte Interaktionen zwischen den 145 DEGs und den sieben identifizierten microRNAs gibt.

6.5 Patientenkohorte mit Leberzirrhose

Im ersten Schritt dieses Versuches sollten die Expressionsniveaus der sieben im ACLF-Mausmodell identifizierten microRNAs in Serumproben von Patienten mit vorbestehender Leberzirrhose quantifiziert werden. Wie bekannt betrifft das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF) Patienten, die bereits an einer Leberzirrhose erkrankt und daraufhin einem akuten leberschädigenden Stimulus ausgesetzt sind [71]. Bei diesem leberschädigenden Stimulus handelt es sich häufig um eine bakterielle Infektion [8]. Aus diesem Grund sollte in diesem Versuch vor allem die Auswirkung des Zusammenspiels von bakterieller Infektion und einer vorbestehenden Leberzirrhose auf die microRNA Expressionsniveaus untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die Expression der sieben microRNAs im Serum von Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller Infektion (n = 11) und Patienten mit stabiler Leberzirrhose (n = 41) im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen. Die klinischen und laborchemischen Daten der Patienten sind in Tabelle 31 dargestellt. Am nächsten an der Pathogenese des ACLF waren die Patienten in der Gruppe „Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion“, weshalb die microRNA-Expressionsprofile in dieser Gruppe besonders interessant waren. Auf den Präfix der microRNAs „*hsa*“, welcher für „*Homo sapiens*“ steht, wurde aus Übersichtlichkeitsgründen im Folgenden verzichtet.

Tabelle 31: Patientencharakteristika

Charakteristika	Kontrollgruppe (n = 7)	Leberzirrhose (n = 41)	Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion (n = 11)
Abkürzung	A	B	C
Alter [in Jahren]	40,6	60,8	59,7
Geschlecht [m/w]	2/5	27/14	9/2
Ätiologie der Leberzirrhose			
Alkohol	/	21	6
Virusinfektion	/	8	1
Andere	/	12	5
Klassifikationssysteme			
MELD-Score (n)	/	14,3 (38)	14,3 (11)
Child-Pugh-Score (n)	/	7,6 (38)	8,5 (11)
Laborparameter			
Bilirubin [mg/dl]	/	2,8	2,4
ASAT [U/l] (n)	/	49,5 (25)	122,7 (10)
ALAT [U/l]	/	54,4	91,6
Albumin [g/l]	/	35,2	32,5
INR	/	1,4	1,3
CRP [mg/l] (n)	/	22,8 (40)	38,4 (11)
Leukozyten (Zellen/nl)	/	6,8	9,5
Kreatinin (mg/dl)	/	1,1	1,5
Natrium (mmol/l)	/	137,9	136,5

Andere = kryptogene Leberzirrhose, nicht-alkoholische Fettlebererkrankung und Autoimmunhepatitis

6.5.1 MicroRNA-Expressionsniveaus bei Patienten mit Leberzirrhose

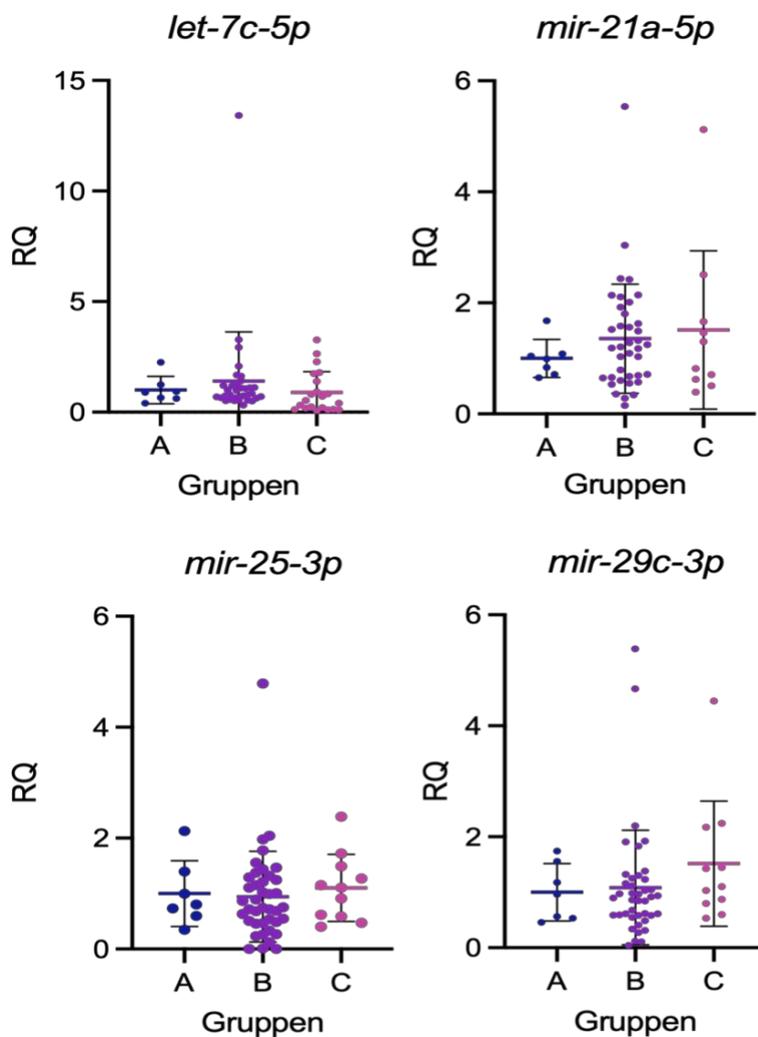
Die Rohdaten der qPCR wurden wie unter 5.4.1.5 beschrieben ausgewertet und anschließend als Einzelwerte grafisch dargestellt. Die Testung mittels des Shapiro-Wilk-Tests ergab keine Normalverteilung für die Daten. Folglich wurden die Daten mittels des Kruskal-Wallis-Tests auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Wenn sich im Kruskal-Wallis-Test Unterschiede zwischen den drei Gruppen (A = Kontrollgruppe, B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und

akute bakterielle Infektion) ergaben, wurde der Dunns Test als Post hoc-Test verwendet, um die Gruppen paarweise auf signifikante Unterschiede zu untersuchen.

6.5.2 Expression von *let-7c-5p*, *mir-21a-5p*, *mir-25-3p* und *mir-29c-3p*

Der Kruskal-Wallis-Test ergab für die Expressionsniveaus der microRNAs *let-7c-5p* (p-Wert = 0,1697), *mir-21a-5p* (p-Wert = 0,8352), *mir-25-3p* (p-Wert = 0,5548) und *mir-29c-3p* (p-Wert = 0,2615) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 23).

Abbildung 23: Expression der microRNAs *let-7c-5p*, *mir-21a-5p*, *mir-25-3p* und *mir-29c-3p* in humanen Serumproben

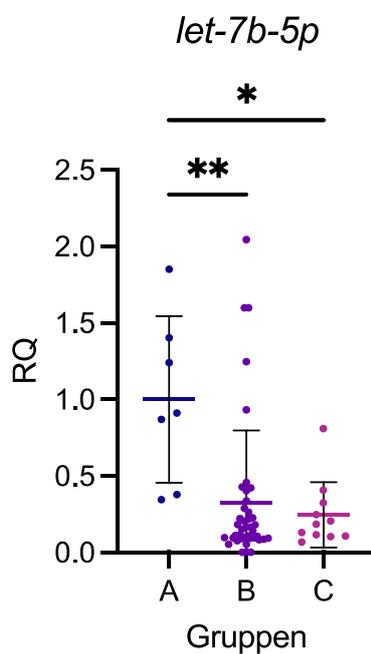


A = Kontrollgruppe, B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test

6.5.3 Expression von *let-7b-5p*, *mir-23a-3p* und *mir-148a-3p*.

Für die Expressionsniveaus der microRNA *let-7b-5p* ergab der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen (p-Wert = 0,0035), dargestellt in Abbildung 24. Die Expression der microRNA *let-7b-5p* war sowohl bei den Patienten mit stabiler Leberzirrhose (B vs. A = $0,3 \pm 0,5$ vs. $1,0 \pm 0,5$; p-Wert= 0,0023) als auch bei den Patienten mit Leberzirrhose und bakterieller Infektion (C vs. A = $0,2 \pm 0,2$ vs. $1,0 \pm 0,5$; p-Wert = 0,0375) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert.

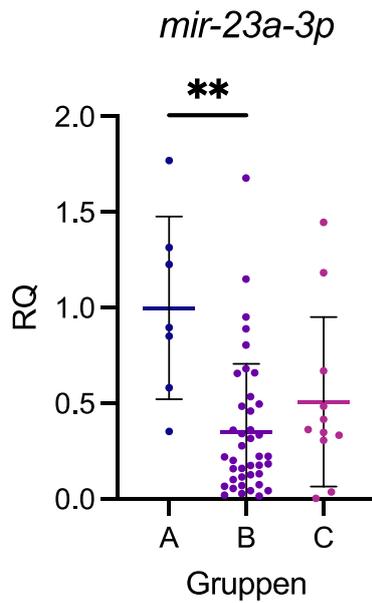
Abbildung 24: Expression von microRNA *let-7b-5p* in humanen Serumproben



A = Kontrollgruppe, B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion

Die Expression von *mir-23a-3p* war bei den beiden Patientengruppen mit Leberzirrhose im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls vermindert (Abbildung 25), wobei dieses Ergebnis nur für die Gruppe der Patienten mit stabiler Leberzirrhose signifikant war (B vs. A = $0,4 \pm 0,4$ vs. $1,0 \pm 0,5$; p-Wert = 0,0027).

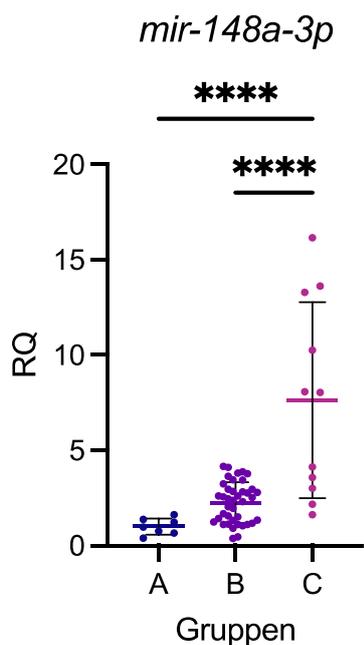
Abbildung 25: Expression von microRNA *mir-23a-3p* in humanen Serumproben



A = Kontrollgruppe, B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion

Am interessantesten war die Expression von microRNA *mir-148a-3p* (Abbildung 26). Diese war bei den Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller gegenüber den Patienten mit stabiler Leberzirrhose (C vs. B = 8 ± 5 vs. 2 ± 1 ; p-Wert < 0,0001) und gegenüber den gesunden Kontrollen (C vs. A = 8 ± 5 vs. $1,0 \pm 0,4$; p-Wert < 0,0001) deutlich erhöht.

Abbildung 26: Expression von *mir-148a-3p* in humanen Serumproben



A = Kontrollgruppe, B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion

6.6 Patientenkohorte mit ACLF

Da der Versuch 6.5 zeigte, dass die Serumspiegel von *mir-148a-3p* durch das Zusammenspiel eines chronischen und eines akut leberschädigenden Ereignisses induziert war, wurde die Expression von *mir-148a-3p* in Serumproben einer Kohorte von ACLF-Patienten (n= 35) quantifiziert. In Tabelle 32 sind die klinischen und laborchemischen Daten der ACLF-Patienten dargestellt.

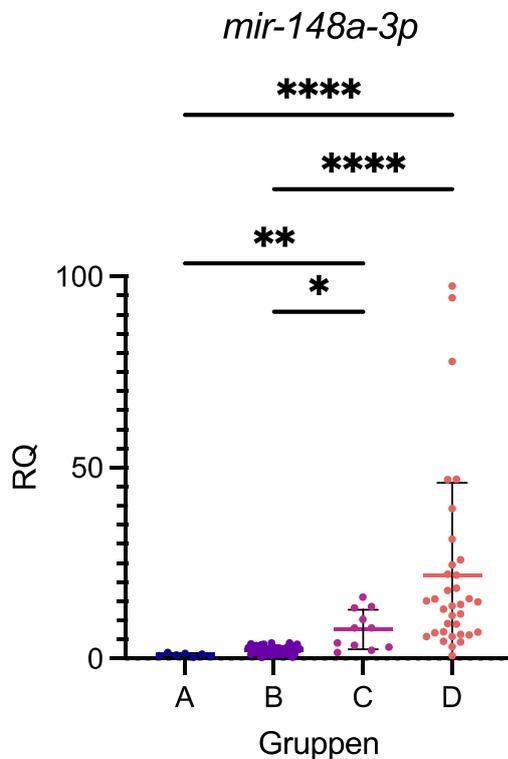
Tabelle 32: Charakteristika der Patienten mit akut-auf-chronischen Leberversagen

Charakteristika	ACLF-Patienten (n = 35)
Abkürzung	D
Alter [in Jahren] (n)	59,9 (31)
Geschlecht [m/w] (n)	22/9 (31)
Ätiologie der Leberzirrhose	
Alkohol	24
Virusinfektion	2
Kryptogen	5
Bakterielle Infektion Ja/Nein	10/25
ACLF-Grad 1	9
ACLF-Grad 2	26
Klassifikationssysteme	
MELD-Score (n)	26,1 (31)
Child-Pugh-Score (n)	10,8 (27)
Laborparameter	
Bilirubin [mg/dl] (n)	9,5 (31)
ASAT [U/l] (n)	142 (26)
ALAT [U/l] (n)	69 (30)
Albumin [g/l] (n)	24,0 (30)
INR (n)	1,8 (24)
CRP [mg/l] (n)	57,6 (30)
Leukozyten (Zellen/nl) (n)	9,7 (31)
Kreatinin (mg/dl) (n)	2,9 (31)
Natrium (mmol/l) (n)	134,5 (31)

6.6.1 MicroRNA-Expressionsniveaus bei Patienten mit ACLF

Die Expression von *mir-148a-3p* war bei den Patienten mit ACLF deutlich höher als bei den gesunden Kontrollen (D vs. A = 22 ± 24 vs. $1 \pm 0,4$; p-Wert < 0,0001) und den Patienten mit stabiler Leberzirrhose (D vs. B 22 ± 24 vs. 2 ± 1 ; p-Wert < 0,0001) (Abbildung 27). Wie unter 6.5 war auch in diesem Vergleich die Expression von *mir-148a-3p* bei den Patienten mit Leberzirrhose und akuter bakterieller Infektion im Vergleich zu den Patienten mit stabiler Leberzirrhose (C vs. B 8 ± 5 vs. 2 ± 1 ; p-Wert = 0,0209) und den gesunden Kontrollen signifikant erhöht (C vs. A 8 ± 5 vs. $1 \pm 0,4$; p-Wert = 0,0032).

Abbildung 27: Expression von *mir-148a-3p* in humanen Serumproben

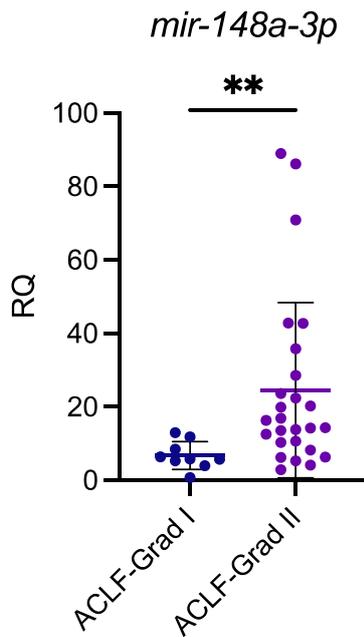


A = Kontrollgruppe, B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D= ACLF

6.6.1.1 Expression von *mir-148a-3p* in Abhängigkeit vom ACLF-Grad

Wie in Abbildung 28 zu sehen, war die Expression von *mir-148a-3p* bei den Patienten mit ACLF-Grad II (n = 26) höher als bei den Patienten mit ACLF-Grad I (n = 9) (ACLF-Grad II vs. ACLF-Grad I = 25 ± 24 vs. 7 ± 4 ; p-Wert = 0,0017; Mann-Whitney-U-Test).

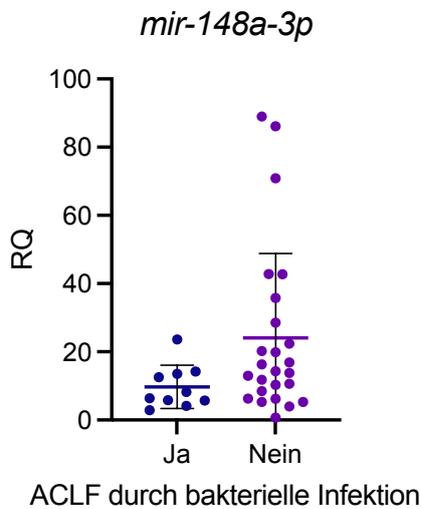
Abbildung 28: Expression von *mir-148a-3p* bei Patienten mit ACLF-Grad I und II



6.6.1.2 Expression von *mir-148a-3p* in Abhängigkeit von bakterieller Infektion

Der Serumspiegel von *mir-148a-3p* war nicht davon abhängig, ob das ACLF durch eine bakterielle Infektion oder ein anderes Ereignis ausgelöst wurde (Ja vs. Nein = 10 ± 6 vs. 24 ± 25 ; p-Wert = 0,0645; Mann-Whitney-U-Test).

Abbildung 29: Expression von *mir-148a-3p* in Abhängigkeit davon, ob das ACLF durch eine bakterielle Infektion ausgelöst wurde

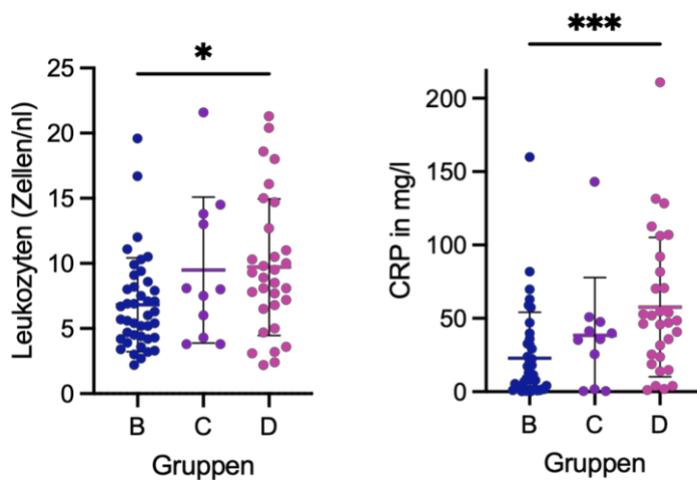


6.6.2 Laborchemische und klinische Daten der Patienten

Für die Gruppen B (Leberzirrhose), C (Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion) und D (ACLF) lagen die unter 6.5 und 6.6 dargestellten laborchemischen und klinischen Daten vor. Die Expression der laborchemischen und die Ausprägung der klinischen Daten wurde im Folgenden zwischen den drei Gruppen verglichen. Die Daten wurden zuerst mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Bei Normalverteilung der Daten wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA (Post hoc-Test: Tukey's-Test), bei nicht Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) angewandt.

Die Patienten mit ACLF wiesen signifikant höhere CRP-Konzentrationen (D vs. B = 58 ± 47 vs. 23 ± 3 mg/l; p-Wert: 0,0004) und Leukozytenzahlen (D vs. B; 10 ± 5 vs. 7 ± 4 pro nl; p-Wert: 0,0361) auf als die Patienten mit Leberzirrhose (Abbildung 30).

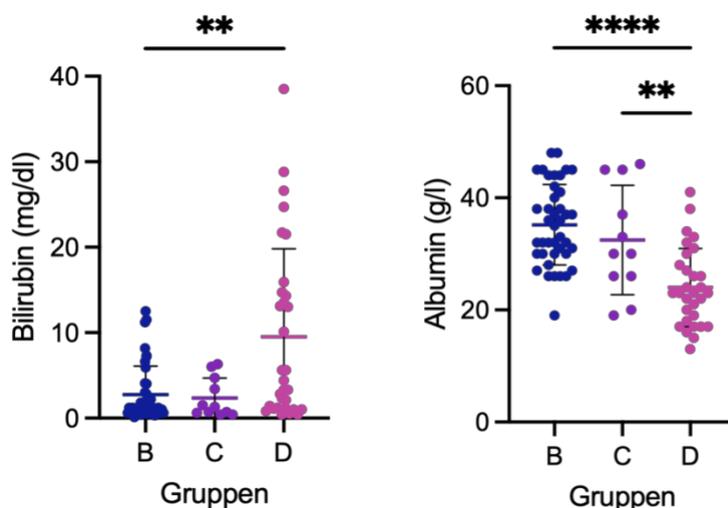
Abbildung 30: CRP und Leukozyten der Patienten



B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D = ACLF, Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Ebenso war das Bilirubin im Serum bei den Patienten mit ACLF signifikant höher als bei den Patienten mit Leberzirrhose (D vs. B; 10 ± 10 vs. 3 ± 3 mg/dl; p-Wert: 0,0066). Das Albumin war bei den ACLF-Patienten geringer als bei den Patienten der anderen beiden Gruppen (D vs. B; 24 ± 7 vs. 35 ± 7 g/l; p-Wert: $< 0,0001$ und D vs. C; 24 ± 7 vs. 32 ± 10 g/l; p-Wert: 0,0055) (Abbildung 31).

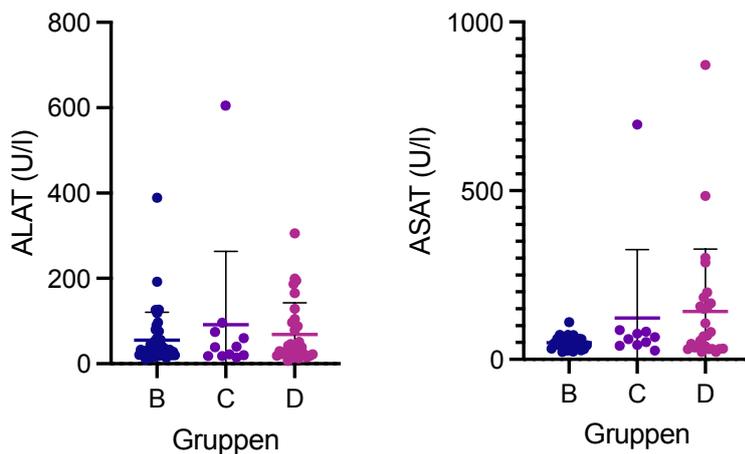
Abbildung 31: Bilirubin und Albumin der Patienten



B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D = ACLF, Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Bezüglich der beiden Transaminasen ALAT (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert: 0,9489) und ASAT (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert: 0,1346) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (Abbildung 32).

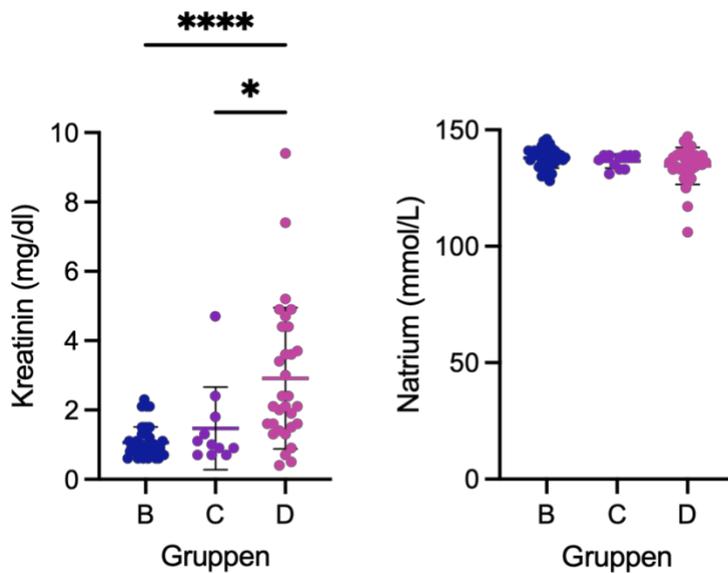
Abbildung 32: ALAT und ASAT der Patienten



B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D = ACLF, Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Die Nierenfunktion der Patienten mit akut-auf-chronischem Leberversagen (gemessen über Kreatinin) war im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen deutlich eingeschränkt (D vs. B = 3 ± 2 vs. $1 \pm 0,5$ mg/dl; p-Wert: $< 0,0001$ und D vs. C; 3 ± 2 vs. 1 ± 1 mg/dl; p-Wert: 0,0301). Die Serumnatriumkonzentrationen unterschieden sich zwischen den drei Gruppen nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert: 0,0828).

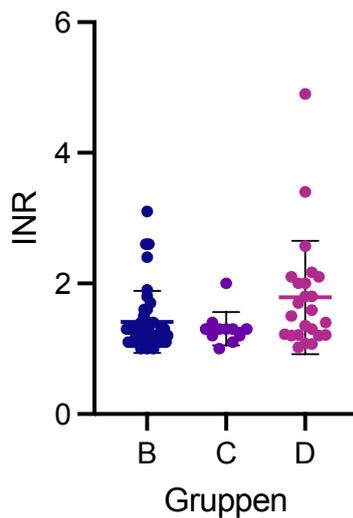
Abbildung 33: Kreatinin und Natrium der Patienten



B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D = ACLF, Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Der INR Wert unterschied sich zwischen den drei Gruppen nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, p-Wert: 0,0545).

Abbildung 34: INR der Patienten

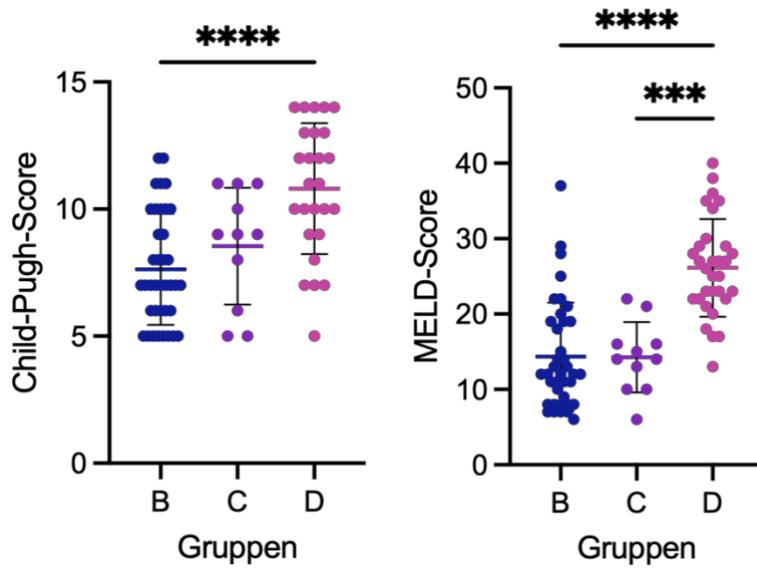


B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D = ACLF, Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

Die Patienten mit akut-auf-chronischem Leberversagen wiesen einen höheren Child-Pugh-Score auf als die Patienten mit Leberzirrhose (D vs. B; 11 ± 3 vs. 8 ± 2 ; p-Wert $< 0,0001$). Der MELD-Score war bei den Patienten mit akut-auf-chronischem Leberversagen höher als bei den

Patienten der beiden anderen Gruppen (D vs. B; 26 ± 6 vs. 14 ± 7 ; p-Wert: $< 0,0001$ und D vs. C; 26 ± 6 vs. 14 ± 5 ; p-Wert: $0,0004$).

Abbildung 35: Child-Pugh und MELD-Scores der Patienten



B = Leberzirrhose, C = Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion, D = ACLF, Kruskal-Wallis-Test (Post hoc-Test: Dunns-Test) mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$

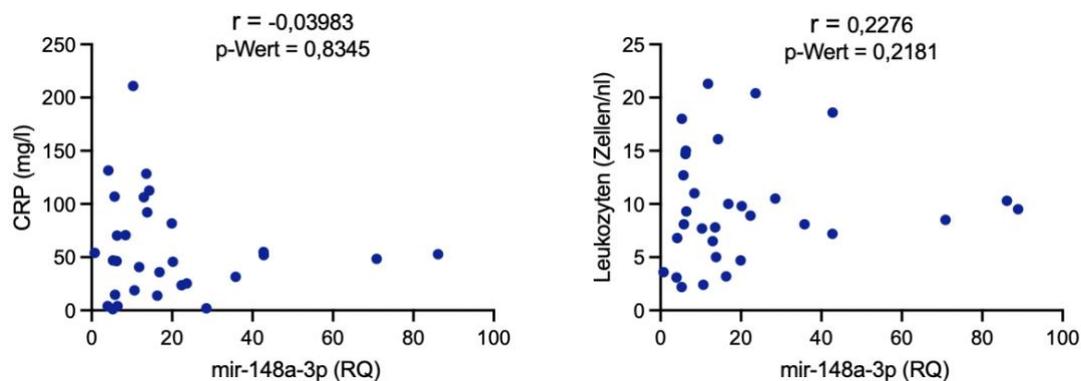
6.6.3 Korrelation des Serumspiegels von *mir-148a-3p* mit laborchemischen und klinischen Daten der ACLF-Patienten

Um eine Korrelation zwischen den Serumspiegeln von *mir-148a-3p* und einem anderen Parameter der Patienten (beispielsweise CRP) herzustellen, wurde zunächst mittels des Shapiro-Wilk-Tests überprüft, ob es sich um normalverteilte Daten handelt. Wenn eine Normalverteilung vorlag, wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman bestimmt.

6.6.3.1 Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit Entzündungsparametern

Die Expression von *mir-148a-3p* korrelierte nicht mit dem laborchemisch bestimmten CRP (n = 30, Spearman $r = -0,03982$, p-Wert = 0,08345) oder den Leukozytenzahlen (n= 31, Spearman $r = 0,2276$, p-Wert = 0,2181).

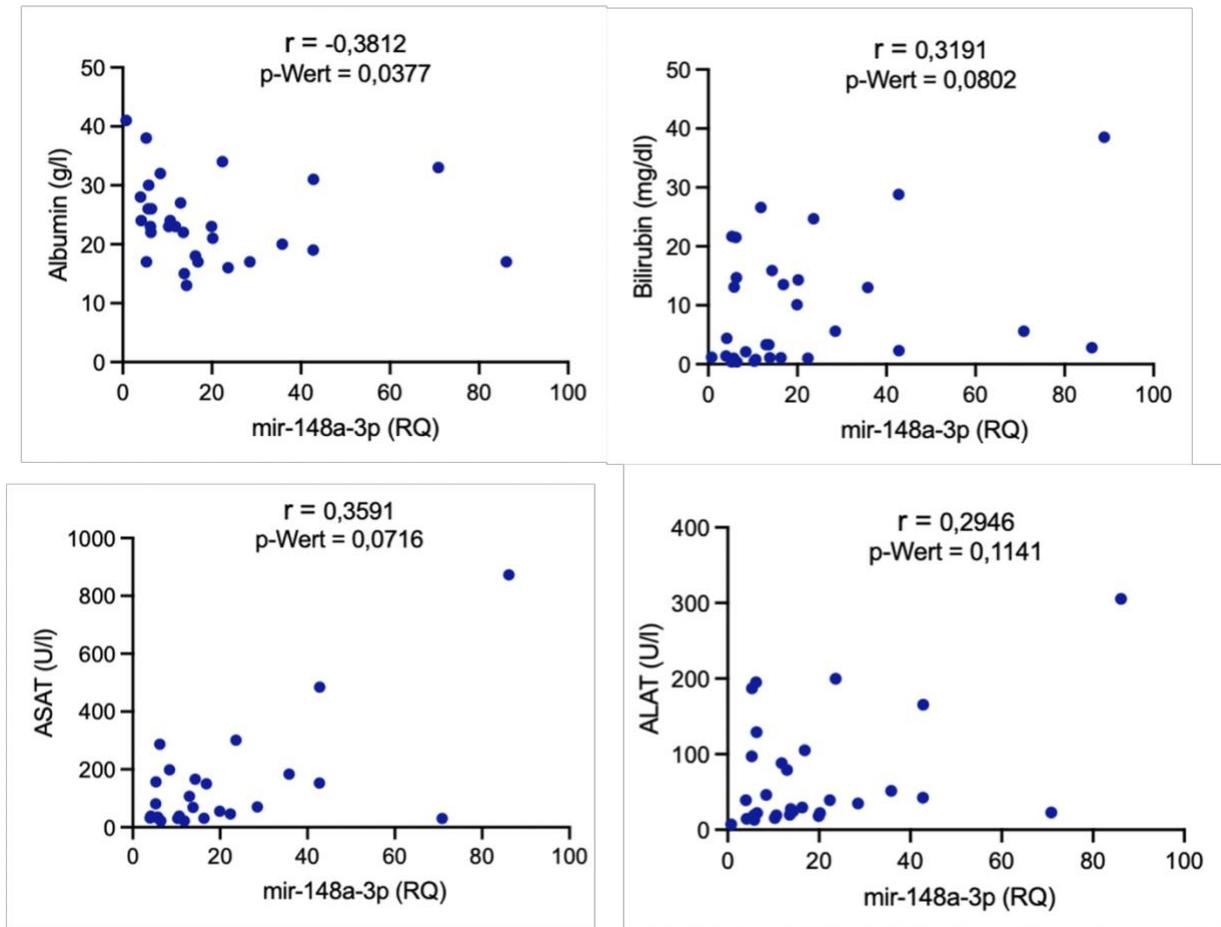
Abbildung 36: Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit CRP und Leukozyten



6.6.3.2 Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit Leberwerten und Syntheseparametern

Die Expression von *mir-148a-3p* korrelierte nicht signifikant mit dem Bilirubin (n = 31, Spearman $r = 0,3191$, p-Wert = 0,0802), ASAT (n = 26, Spearman $r = 0,3591$, p-Wert = 0,0716) oder ALAT (n = 30, Spearman $r = 0,2946$, p-Wert = 0,1141). Die Höhe des laborchemisch bestimmten Albumins korrelierte schwach negativ mit der Expression von *mir-148a-3p* (n = 30, Spearman $r = 0,2946$, p-Wert = 0,1141).

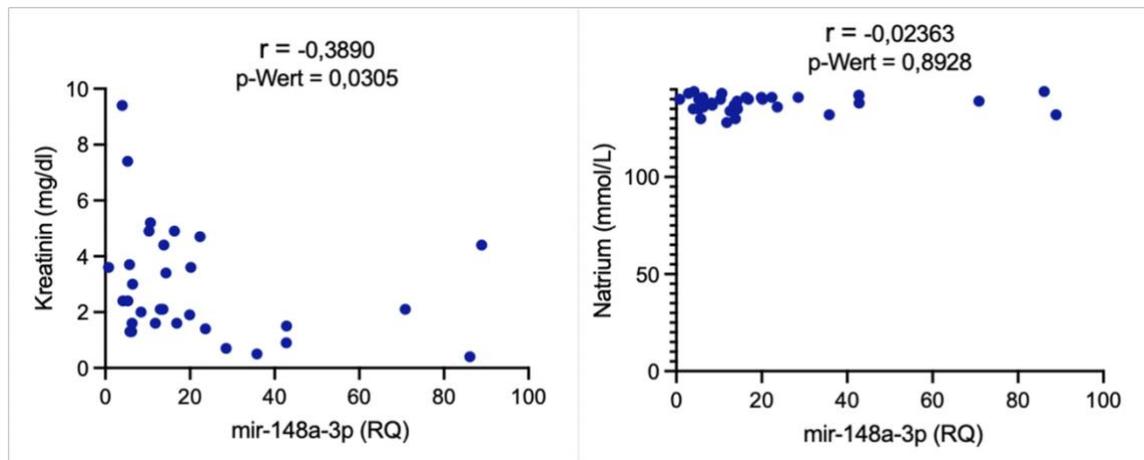
Abbildung 37: Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit Albumin, Bilirubin, ASAT und ALAT



6.6.3.3 Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit Parametern der Nierenfunktion und des Elektrolythaushalts

Die Nierenschädigung (gemessen über Kreatinin) korrelierte moderat negativ mit dem Serumspiegel von *mir-148a-3p* ($n = 31$, Spearman $r = -0,3890$, $p\text{-Wert} = 0,0305$). Die Serumkonzentration korrelierte hingegen nicht mit dem Serumspiegel von *mir-148a-3p* ($n = 35$, Spearman $r = 0,02363$, $p\text{-Wert} = 0,8928$).

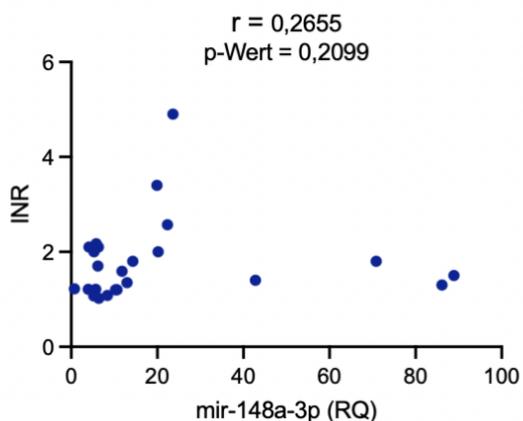
Abbildung 38: Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit Kreatinin und Natrium



6.6.3.4 Korrelation der Expression von *mir-148a-3p* mit dem INR

Der INR-Wert korrelierte nicht mit der Menge der im Serum zirkulierenden *mir-148a-3p* ($n = 24$, Spearman $r = 0,2655$, p-Wert = $0,2099$).

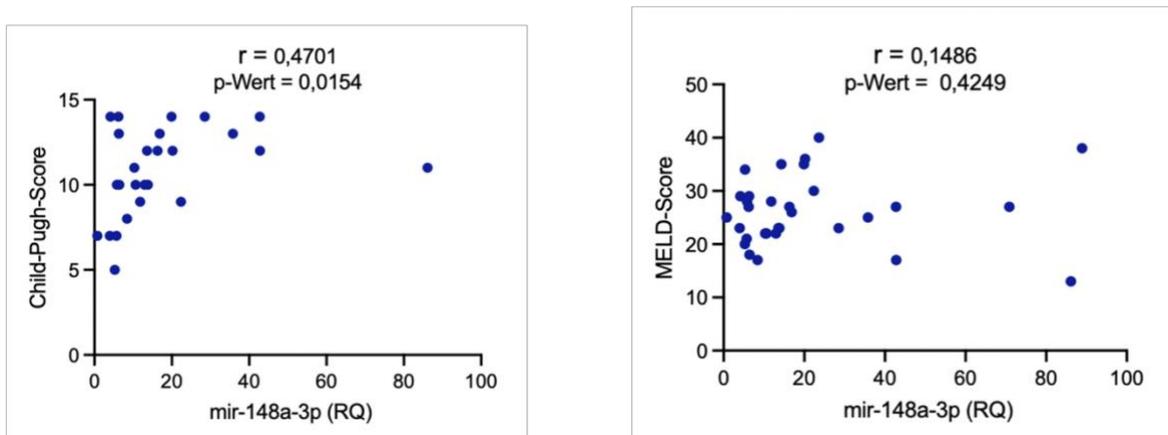
Abbildung 39: Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit dem INR



6.6.3.5 Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit der Stadieneinteilung der Leberzirrhose

Die Menge im Serum zirkulierender *mir-148a-3p* korrelierte moderat positiv mit der Anzahl der Punkte nach den Child-Pugh-Kriterien ($n = 26$, Spearman $r = 0,4701$, p-Wert = $0,0154$), wohingegen sich für die Punkte nach den MELD-Kriterien keine signifikante Korrelation ergab ($n = 31$, Spearman $r = 0,1486$, p-Wert = $0,4249$).

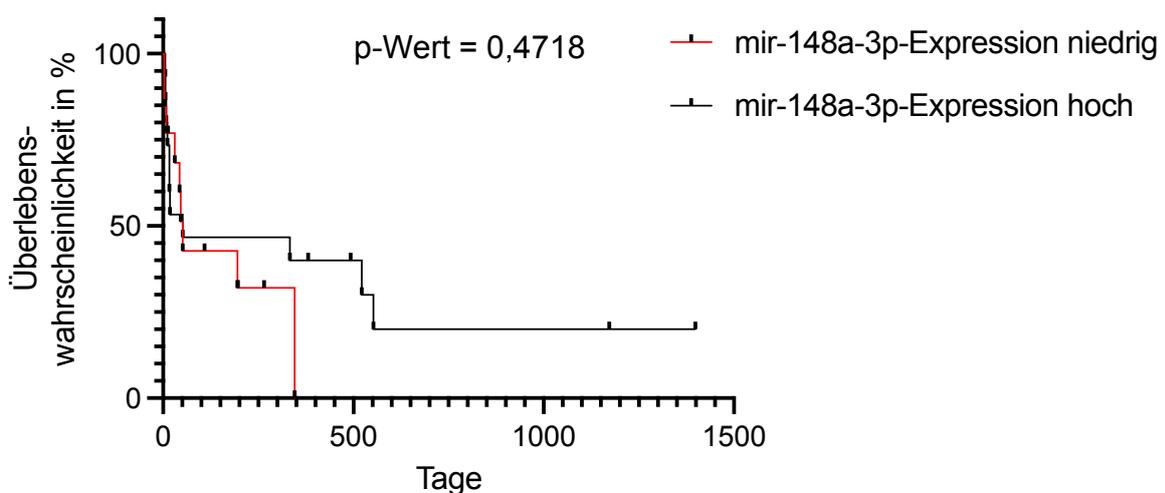
Abbildung 40: Korrelation der Serumspiegel von *mir-148a-3p* mit Child-Pugh und MELD-Scores



6.6.4 Überlebenszeitanalysen der ACLF-Patienten

Für 28 ACLF-Patienten lagen vollständige Follow-Up-Daten vor, hierbei betrug der mittlere Zeitraum von Entnahme der Serumprobe bis zur Follow-Up-Untersuchung 225 Tage. Die ACLF-Patienten wurden anhand der medianen *mir-148a-3p*-Expression (Median: 12,94 RQ) in zwei Gruppen [*mir-148a-3p*-Expression niedrig ($n = 13$), *mir-148a-3p*-Expression hoch ($n = 15$)] dichotomisiert, und ihr Gesamtüberleben wurde verglichen. Das mediane Überleben betrug in beiden Gruppen 51 Tage, und das Gesamtüberleben unterschied sich nicht signifikant (Log-rank-test, p-wert: 0,4718).

Abbildung 41: Kaplan-Meier Kurve der Überlebensraten der ACLF-Patienten



7 Diskussion

Das akut-auf-chronische Leberversagen (ACLF) wurde, nach der in dieser Arbeit gebrauchten Definition, erstmals im Jahre 2013 definiert. Es handelt sich um ein hochdynamisches Krankheitsbild mit einer hohen Mortalität [99]. Für unsere Arbeitsgruppe war das ACLF als Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen aus den folgenden Gründen interessant: Das, für die Prognose des ACLF entscheidende, Versagen extrahepatischer Organe scheint durch eine generalisierte Dysfunktion des Immunsystems hervorgerufen zu werden [91]. Die zugrundeliegende Pathophysiologie dieser Immundysfunktion ist nur unvollständig verstanden und sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer beleuchtet werden, um den Weg zu einer spezifischen Therapie des ACLF zu bahnen [60,133]. Für die Behandlungsqualität von Patienten mit ACLF ist es wichtig, die Krankheit frühestmöglich zu diagnostizieren und Patienten mit schweren Verläufen (höhere ACLF-Grade) zu identifizieren. Hierdurch kann eine frühzeitige intensivstationäre Überwachung und gegebenenfalls Evaluation zur Lebertransplantation angestrebt werden. Aus diesem Grund werden Biomarker, welche die Entwicklung und den Verlauf des ACLF anzeigen, dringend benötigt [65,130]. Diese Arbeit hatte das Ziel, solche Biomarker in einem zweistufigen Ansatz – bestehend aus einem Mausmodell und Kohortenstudien - zu identifizieren. Als potentielle Biomarker wurden microRNAs ausgewählt, da diese aufgrund ihrer Stabilität, der leichten Nachweisbarkeit in biologischen Proben und ihrer hohen Spezifität als vielversprechende Kandidaten in der Literatur beschrieben sind [29,81]. Um die komplexe Pathophysiologie des ACLF zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuartiges transgenes ACLF-Mausmodell verwendet, welches in unserer Arbeitsgruppe etabliert wurde [78]. Tiermodelle sind für die Untersuchung der molekularen Grundlagen des ACLF gut geeignet, da sie die zweistufige Krankheitsentstehung (chronischer Leberschaden + akuter Auslöser) stabil reproduzieren und vielfältige molekularbiologische Untersuchungen erfolgen können [54]. Eine Stärke unseres Mausmodelles sind die differenziellen Interventionsgruppen bestehend aus chronischem Leberschaden (*Abcb4*-defizienten Mäuse + NaCl-Injektion), akutem Leberschaden (*C57BL/6J*-Wiltyp Mäuse + LPS-Injektion) und akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-defiziente Mäuse + LPS-Injektion). Durch den Vergleich jeder dieser Interventionsgruppen mit einer Kontrollgruppe (*C57BL/6J*-Wiltyp Mäuse + NaCl-Injektion) lässt sich feststellen, welche pathophysiologischen Veränderungen der akuten (*C57BL/6J*-Wiltyp Mäuse + LPS-Injektion) oder chronischen Komponente (*Abcb4*-defizienten Mäuse + NaCl-Injektion) zuzuschreiben sind. Vor allem aber kann so untersucht werden, welche pathophysiologischen Veränderung nur durch das Vorliegen beider Komponenten (*Abcb4*-defiziente Mäuse + LPS-Injektion)

auftreten. Obgleich das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell die zweistufige Pathophysiologie des ACLF widerspiegelt, handelt es sich hierbei nur um ein unvollständiges Abbild der klinischen Realität des ACLF. Denn gleichwohl bakterielle Infektionen als häufigste Auslöser des ACLF gelten, sind auch die alkoholische Hepatitis, die gastrointestinale Blutung mit Kreislaufschock und die toxische Enzephalopathie gesicherte ACLF-Auslöser. Zudem können diese Auslöser auch kombiniert auftreten, und der Zeitraum zwischen auslösendem Ereignis und ACLF-Beginn scheint variabel zu sein [99,123]. Bisher ist in der Literatur kein Tiermodell beschrieben, welches alle im Menschen beobachteten Faktoren des ACLF vereint und auch unser Mausmodell kann diesem Anspruch nur in Teilen gerecht werden [54,59]. In Ermangelung eines idealen ACLF-Tiermodells müssen die Ergebnisse aus den Tierversuchen im Kontext mit denen anderer Versuchsreihen gesehen werden. So wurde beispielsweise in unserer Arbeitsgruppe ein weiteres Mausmodell entwickelt, in welchem eine alkoholische Hepatitis als Auslöser des ACLF dient [77]. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Arbeiten könnte Ausgangspunkte für zukünftige Arbeiten bieten. Zudem ist darauf hinzuweisen, dass es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten Mausmodell technisch um „acute-on-chronic liver injury“ handelt, da die offiziellen EASL-CLIF Diagnosekriterien des ACLF (akute Dekompensation der Leberzirrhose, Multiorganversagen und hohe 28-Tage Mortalität) in diesem Mausmodell nicht erfasst wurden [99]. In dieser Arbeit wurden sowohl microRNA-PCR-Arrays als auch mRNA-Sequenzierung an Leberproben aus dem Mausmodell vorgenommen. Ziel dieser umfangreichen Untersuchungen war es, von deskriptiven Beobachtungen auf microRNA-Ebene auf nachgeschaltete Mechanismen auf mRNA-Ebene zu schließen. Obwohl wir im Tiermodell dezidierte Unterschiede in der microRNA und mRNA-Expression zwischen allen vier Gruppen festgestellt haben, konnten wir letztendlich keine plausible microRNA-mRNA-Interaktion in der Pathophysiologie des ACLF identifizieren. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von ACLF-Serumproben standen uns für die Kohortenstudien anfangs nur Serumproben von Patienten mit Leberzirrhose und einer akuten bakteriellen Infektion zur Verfügung, um den akut-auf-chronischen Leberschaden im Menschen zu untersuchen. Obwohl diese Patienten (noch) nicht an ACLF nach den EASL-CLIF-Kriterien erkrankt sind, brachte die Verwendung ihrer Serumproben zwei Vorteile mit sich: Erstens gleichen sie pathophysiologisch der Gruppe des Mausmodells mit akut-auf-chronischem Leberschaden (*Abcb4*-defiziente Mäuse + LPS-Injektion), da auch diese formal an „acute-on-chronic-liver injury“ erkrankten. Zweitens ähnelte diese Kohorte einem kürzlich beschriebenen prä-ACLF-Phänotyp, so dass hier gegebenenfalls Rückschlüsse auf die prädiktive Qualität des Biomarkers möglich sind [122]. Nach den initialen Beobachtungen in

dieser Kohorte wurden 35 Serumproben von ACLF-Patienten zur weiteren Analyse durch ein externes Zentrum zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine der größten in der Literatur beschriebenen ACLF-Kohorten, in denen microRNAs untersucht wurden [17,31].

mRNA-Sequenzierung: Inflammatorisches Genexpressionsmuster der ACLF-Mäuse

Die Daten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mRNA-Sequenzierung sind umfangreich und sollen Ausgangspunkt für weitere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe sein. Folglich wird sich die Diskussion dieser Daten auf einige wesentliche Erkenntnisse fokussieren. In der Hauptkomponentenanalyse (PCA) zeigt sich, dass die vier Versuchsgruppen des Mausmodells deutlich unterschiedliche Cluster bilden (vgl. Abbildung 13). Folglich liegen den pathophysiologischen Veränderungen zwischen dem gesunden Normalzustand [Kontrollgruppe (WT + NaCl)] und den verschiedenen Arten der hepatischen Schädigung [chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl), akuter Leberschaden (WT + LPS) und akut-auf-chronischer Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS)] klare Unterschiede in der intrahepatischen Genexpression zugrunde. In dieser Arbeit ist es somit gelungen zu zeigen, dass Mäuse mit akut-auf-chronischen Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS) ein spezifisches intrahepatisches Genexpressionsmuster aufweisen, welches sich sowohl von Mäusen mit einem akuten Leberschaden (WT + LPS) als auch von Mäusen mit einem chronischen Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) abgrenzt. Die Genexpressionsdaten stützen somit das aktuell in der Literatur favorisierte Konzept, wonach das ACLF ein eigenes Krankheitsbild darstellt, welches sich von der zur akuten und chronischen Leberschädigung unterscheidet.

Die Gene Ontology-Anreicherungsanalysen der 145 identifizierten DEGs der Versuchstiere mit akut-auf-chronischen Leberschaden (*Abcb4*-Defizienz + LPS), zeigten, dass diese Gene überwiegend an zellulären und immunologischen Prozessen beteiligt sind. Unter die Prozesse auf zellulärer Ebene (vgl. Tabelle 21: Zelluläre Prozesse und Regulation zellulärer Prozesse) fallen neben Prozessen innerhalb der Zelle auch Prozesse der Zell-Zell-Kommunikation [28]. Zu diesen Termini gehören auch Gene für inflammatorische Zytokine wie CCL4 (engl. CC-chemokine ligand 4), CCL5 (engl. CC-chemokine ligand 5) und CCL22 (engl. CC-chemokine ligand 22), welche an der Entwicklung und Aufrechterhaltung inflammatorischer Prozessen beteiligt sind [115]. Zu den Genen, welche unter immunologischen Prozessen (vgl. Tabelle 21: Prozess des Immunsystems, Reaktion auf Stimulus) subsummiert werden, gehören beispielweise die Gene für CAMP (engl. Cathelicidin Antimicrobial Peptide) und CASP (engl. Caspase 4). CAMP spielt innerhalb des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei

der Verteidigung gegen externe Pathogene, und CASP 4 steuert die Produktion proinflammatorischer Proteine [115]. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen ein ACLF mittels *Abcb4*-Defizienz und LPS-Injektion induziert wird, ein intrahepatisches Genexpressionsmuster präsentieren, welches von einer hohen Aktivität immunologisch-inflammatorischer Prozesse geprägt ist. Vor dem Hintergrund, dass die ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) dieses inflammatorische intrahepatische Genexpressionsmuster nicht nur im Vergleich zu gesunden Versuchstieren (WT + NaCl), sondern auch im Vergleich zu Versuchstieren mit chronischer (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) und akuter Leberschädigung (WT + LPS) präsentieren, wird deutlich, wie viel stärker die hepatische Inflammation bei der dualen Schädigung des ACLF im Vergleich zu einer singulären Leberschädigung (akut/chronisch) ist. Zwischenzeitlich untersuchten auch Liang *et al.* die spezifische Genexpression beim ACLF *in silicio* mittels bioinformatischer Methoden. Ihre Gene Ontology-Anreicherungsanalysen zeigten die starke Anreicherung von Genen, welche an immunologischen und metabolischen Prozessen beteiligt sind [88]. Diese bioinformatischen Beobachtungen stützen somit die Ergebnisse unserer *in vitro*-Versuche, denn neben den bereits beschriebenen immunologischen und zellulären Prozessen wiesen unsere Analysen auch die auffällige Häufung von Genen, welche an metabolischen Prozessen beteiligt sind nach (vgl. Tabelle 28). Bezüglich der auffälligen Aktivität metabolischer Prozesse beim ACLF wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung des Immunsystems zu einem erhöhten Energieverbrauch führt, welcher schlussendlich über ein Energiedefizit zum Multiorganversagen beiträgt [10,100].

Die Ergebnisse der KEGG-Pfadanalysen zeigen, dass die den DEGs nachgeschalteten Signalkaskaden (vgl. Tabelle 29: Cytokine-Cytokine Receptor Interaction, Toll-like Receptor Signaling Pathway) im angeborenen und adaptiven Immunsystem verschaltet sind. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Gene Ontology-Anreicherungsanalysen konnte in dieser Arbeit Evidenz dafür gewonnen werden, dass eine ausgeprägte Immunreaktion ein Schlüsselmechanismus des ACLF ist. Die aktuellen Theorien der Inflammation als wesentliche Komponente des ACLF scheinen also begründet [10,15]. Hervorzuheben ist, dass unsere tierexperimentellen Daten zeigen, dass beim ACLF ein intrahepatisches inflammatorisches Genexpressionsmuster vorliegt, wohingegen sich die aktuellen Theorien vor allem auf eine systemische Inflammation berufen. Eine aktuelle Arbeit (06/2022) von Graupera *et al.* konnte an einer Kohorte von ACLF-Patienten (n=8) ebenfalls ein intrahepatisches Genexpressionsmuster nachweisen, welches mit inflammatorischen Prozessen assoziiert ist

[57]. Folglich wird die Annahme, dass beim ACLF ein inflammatorisches Genexpressionsmuster in der Leber vorliegt sowohl durch tierexperimentelle als auch durch humane Versuchsreihen gestützt und sollte bei weiteren Untersuchungen berücksichtigt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Arbeit 145 DEGs identifiziert wurden, welche beim ACLF intrahepatisch exprimiert werden. Ein Großteil dieser Gene kodiert für Proteine, welche an inflammatorischen, zellulären und metabolischen Prozessen beteiligt sind. Schlussendlich sind weitere Arbeiten nötig, um ihre genauen molekularen Funktionen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des ACLF zu ermitteln und hieraus therapeutische Konsequenzen abzuleiten.

Muster inflammatorischer microRNAs im ACLF-Mausmodell

In den Tierversuchen konnten wir ein Muster bestehend aus sechs microRNAs (*mmu-miR-21a-5p*, *mmu-let-7b-5p*, *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-23a-3p*, *mmu-miR-29c-3p* und *mmu-miR-148a-3p*) identifizieren, welches bei den ACLF-Mäusen (*Abcb4*-Defizienz + LPS) verändert reguliert wird. Zusammen mit einer Arbeit von Zhang *et al.* handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die ersten in der Literatur beschriebene Untersuchungen, welche die biologische Rolle von microRNAs im ACLF anhand von Mausmodellen strukturiert untersuchen [136].

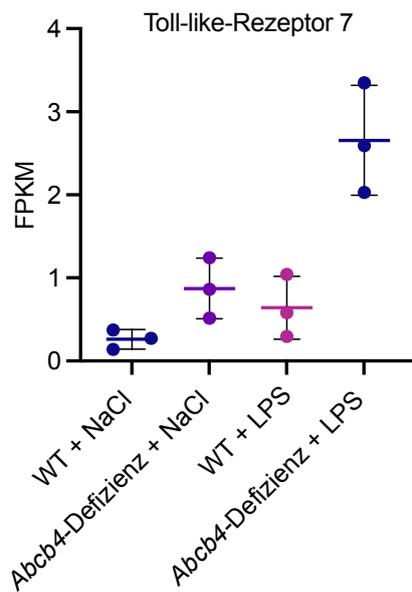
Im Zuge der Translation der Ergebnisse von der Maus zum Menschen konnten die Ergebnisse für *mmu-miR-148a-3p* (*hsa-miR-148a-3p* im Menschen) bestätigt werden, welche später detailliert diskutiert werden. Die Ergebnisse für die übrigen microRNAs bestätigten sich entweder nicht (*mmu-miR-21a-5p*, *mmu-let-7c-5p*, *mmu-miR-23a-3p*, *mmu-miR-29c-3p*), oder es ergaben sich teilweise gegenteilige Ergebnisse (*mmu-let-7b-5p*) in den humanen Serumproben. Obwohl sich die pathophysiologischen Veränderungen zwischen den ACLF-Mäusen (*Abcb4*-Defizienz + LPS) und den Menschen aus der Gruppe „Leberzirrhose und akute bakterielle Infektion“ ähneln, unterscheiden sich die Experimente dahingehend, dass bei den Mäusen die Expression der microRNAs im Lebergewebe und bei den Patienten im Serum gemessen wurde. Dieser Umstand erklärt wahrscheinlich, dass sich nicht alle Ergebnisse aus den Mausversuchen im Menschen bestätigen ließen; denn die Expression von microRNAs wird zeitlich und räumlich streng kontrolliert, so dass die Spiegel einer microRNA zwischen zwei Organsystemen (z.B. Blut und Leber) im selben Organismus unterschiedlich sein können [58]. Zudem gibt es, auch wenn microRNAs evolutionär zwischen vielen Spezies ähnlich exprimiert werden, Unterschiede in der microRNA-Expression zwischen Mensch und Maus [113]. Im Folgenden werden die Ergebnisse der microRNA-Arrays aus den Mausversuchen isoliert

diskutiert, da diese Ergebnisse, auch ohne die Bestätigung im Menschen, relevante Einblicke in die Pathophysiologie des ACLF liefern.

Trotz der kleinen Versuchstierzahl von $n = 3$ waren *mmu-let-7b-5p* und *mmu-miR-21a-5p* in dem Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT + LPS) signifikant hochreguliert. In Lebergewebe der Mäuse mit chronischer (*Abcb4*-Defizienz + NaCl) und akuter Leberschädigung (WT + LPS) waren *mmu-let-7b-5p* und *mmu-miR-21a-5p* im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT + NaCl) unverändert exprimiert. In einer Arbeit von Sheedy wurde die Rolle der *miR-21*-Familie (*mmu-miR-21a-5p* ist Bestandteil *miR-21*-Familie) als Regulator der Immunantwort in Säugetieren beschrieben, welcher sowohl die anfänglichen proinflammatorischen Prozesse als auch die späteren antiinflammatorischen Prozesse zu regulieren scheint. Sheedy zeigte auf, dass *miR-21* ein wichtiger Marker für die Aktivität des Immunsystems in verschiedenen Zusammenhängen ist und die erhöhte Expression von *miR-21* als genereller Biomarker für inflammatorische Erkrankungen dienen kann [116]. Hierzu kongruent konnten Boubaker *et al.* zeigen, dass *mmu-miR-21a-5p* in Lebergewebe von *C57BL/6J*-Wilytyp Mäusen nach Infektion mit *Echinococcus multilocularis* verstärkt exprimiert wird [21]. In dieser Arbeit (6.3.1 in Abbildung 18 - 20) konnte gezeigt werden, dass *mmu-miR-21a-5p* im Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) signifikant hochreguliert ist. Vor dem Hintergrund der beschriebenen Hochregulation von *miR-21* bei proinflammatorischen Prozessen, stützen diese Ergebnisse die These der systemischen Inflammation als treibende Kraft des ACLF [15].

Im Lebergewebe der Versuchstiere der ACLF-Gruppe (*Abcb4*-Defizienz + LPS) war die Expression von *mmu-let-7b-5p* signifikant erhöht. In Übereinstimmung hierzu konnten Massey *et al.* zeigen, dass die Expression von *hsa-let-7b* (Analog zu *mmu-let-7b* in der Maus) im Lebergewebe von Patienten mit alkoholischer Hepatitis erhöht war. Ferner schlussfolgerten die Autoren, dass die microRNA *hsa-let-7b* den Toll-like-Rezeptor 7 direkt aktiviert und somit zu einer hyperakuten Immunreaktion führt, welche den Progress der alkoholischen Hepatitis verantwortet [92]. Diese Hypothese stützend zeigte die Untersuchung der differentiell exprimierten Gene in der mRNA-Sequenzierung, dass der Toll-like Rezeptor 7 im Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) ebenso hochreguliert war.

Abbildung 42: Expression des Toll-like-Rezeptors 7 in Lebergewebe der Versuchstiere



FPKM = Fragments Per Kilobase Million, p-Wert = 0,0004, WT + NaCl (n = 3), *Abcb4*-Defizienz + NaCl (n = 3), WT + LPS (n=3), *Abcb4*-Defizienz + LPS (n = 3)

Die Pathophysiologie der alkoholischen Hepatitis ist eng mit der des ACLF verknüpft und die alkoholische Hepatitis ist häufig Auslöser eines ACLF [123]. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass in dem Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) sowohl die *mmu-let-7b-5p* als auch Toll-like-Rezeptor-7 hochreguliert sind. In Zusammenschau mit den Erkenntnissen von Massey *et al.* lässt sich somit schlussfolgern, dass der microRNA *let-7b*/Toll-like-Rezeptor-7 Pathway eine Schlüsselrolle bei dem Progress der hepatischen Inflammation einnehmen könnte.

Passend zu den Ergebnissen von *mmu-let-7b-5p* konnten wir ebenso zeigen, dass auch *mmu-let-7c-5p* in Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) hochreguliert war, wobei dieses Ergebnis (p-Wert = 0,057251) als statistischer Trend gewertet wurde. *Mmu-let-7c-5p* gehört, sowie auch *mmu-let-7b-5p*, zur Familie der *let-7-microRNAs* in der Maus. Wu *et al.* konnten zeigen, dass eine verminderte Expression von *mmu-let-7c-5p* die Fähigkeit von Mäusen, Lebergewebe nach einer Verletzung zu regenerieren, verbessert [131]. In Zusammenschau mit unseren Ergebnissen unterstreicht dies die biologische Rolle von *mmu-let-7c-5p* bei Leberkrankheiten. Die beiden identifizierten microRNAs (*mmu-let-7b-5p* und auch *mmu-let-7c-5p*) der *let-7*-Familie erfüllen jedoch nicht nur einzeln die jeweiligen beschriebenen biologischen Funktionen, sondern sind auch gemeinschaftlich als *let-7*-Familie an basalen biologischen Prozessen (z.B. Zellproliferation) beteiligt [85]. Hierbei agieren sie oft

redundant und werden als gemeinsames Cluster exprimiert, was dazu passt, dass zwei Mitglieder der *let-7*-Familie als hochreguliert identifiziert wurden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *mmu-miR-23a-3p* im Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) vermehrt exprimiert wurde. Damit übereinstimmend konnten Kim *et al.* zeigen, dass *mmu-miR-23a-3p* Steatose und Inflammation in murinen Hepatozyten beeinflusst. Eine erhöhte hepatische *mmu-miR-23a-3p*-Expression war in den Experimenten von Kim *et al.* mit vermehrtem Stress des endoplasmatischen Retikulums assoziiert, welcher über die Apoptose von Hepatozyten zu Leberschädigung und hepatischer Inflammation führt [83,137]. Wang *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass eine reduzierte Expression von *hsa-miR-23a-3p* (Analogon zu *mmu-miR-23a-3p*) in humanen Hepatozyten mit einer mildereren hepatischen Inflammation bei alkoholischer Hepatitis einhergeht [127]. Sun *et al.* zeigten, dass *mmu-miR-23a-3p* die LPS-induzierte Entzündung in murinen Makrophagen *in vitro* hemmt. In diesen führte die Überexpression von *mmu-miR-23a-3p*, über die posttranskriptionelle Hemmung des inflammatorischen Zytokins *High-Mobility-Group-Box-1 (HMGB1)*, zu einer verringerten Expression von TNF- α und IL-6 [119]. Dies verdeutlicht, dass die biologische Funktion von *mmu-miR-23a-3p* bei Entzündungsprozessen je nach Organsystem unterschiedlich sein kann.

Auch *mmu-miR-29c-3p* war im Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) vermehrt exprimiert. Hierzu übereinstimmend zeigten Cai *et al.*, dass *mmu-miR-29c-3p* in Lebergewebe von Mäusen mit alkoholischer Steatohepatitis erhöht ist und über den IL-17-Signalweg zu einem Ungleichgewicht von Th17-Helfer-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen führt [24]. Für die Hochregulation von *mmu-miR-148a-3p* im Lebergewebe der ACLF-Mäuse (*Abcb4*-Defizienz + LPS) ergab sich ein positiver Trend. Wie für die anderen identifizierten microRNAs ist auch für *mmu-miR-148a-3p* eine biologische Rolle bei inflammatorischen Prozessen beschrieben. Auf die Einzelheiten wird an anderer Stelle eingegangen, da schlussendlich *hsa-miR-148a-3p* (humanes Analogon zu *mmu-miR-148a-3p*) als potentieller Biomarker des ACLF im humanen Serum identifiziert wurde und daher detailliert diskutiert wird.

Die Untersuchungen zeigen somit, dass wir im Mausmodell sechs microRNAs nachweisen konnten, welche beim ACLF hochreguliert sind. In der Literatur gab es bereits Evidenz für die Beteiligung dieser microRNAs bei hepatischer Inflammation und Leberschädigung. Eine weitere microRNA (*mmu-miR-25-3p*) wurde aufgrund von Literaturrecherchen in die

Patientenstudien integriert. Damit waren die Versuche im Mausmodell erfolgreich, und wir konnten sowohl die Evidenz eine Rollen der identifizierten microRNAs bei inflammatorischen Prozessen stärken als auch deren Beteiligung beim ACLF im Mausmodell erstmalig nachweisen. Zudem bestätigt der Umstand, dass die identifizierten microRNAs vorwiegend an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, die „systemic inflammation hypothesis“ (SIH), wonach das ACLF wesentlich durch eine systemische Inflammation bedingt ist [15]. In den folgenden Patientenstudien konnte nun der Frage nachgegangen werden, ob sich diese microRNAs auch als Biomarker im humanen Serum für die Diagnose des ACLF eignen.

microRNA-mRNA-Interaktionen

Wie unter 6.4 gezeigt konnte keine Interaktion zwischen den identifizierten microRNAs und den DEGs im Mausmodell hergestellt werden. Zur Analyse der microRNA-mRNA-Interaktionen wurden nur Interaktionen gewählt, welche bereits experimentell validiert wurden. Folglich ist eine mögliche Erklärung für das negative Ergebnis, dass es eine solche Interaktion zwar gibt, sie aber noch nicht experimentell bestätigt wurde. Ein möglicher Lösungsansatz wäre es, die computergestützten *in silico*-Analysen auf alle potentiell möglichen microRNA-mRNA-Interaktionen auszuweiten und diese dann selbst experimentell zu untersuchen. Die experimentelle Validierung ist bei diesem Ansatz essentiell, da die *in silico*-Analysen zur Vorhersage potentieller microRNA-mRNA-Interaktionen eine hohe falsch-positiv Rate haben [50]. Ein anderes Problem ist, die Möglichkeit von falsch-negativen Ergebnissen bei der Vorhersage potentieller microRNA-mRNA-Interaktionen. Ein Möglichkeit diesem Problem entgegenzuwirken ist es, sich einer Vielzahl computergestützter Werkzeuge für die Vorhersage von microRNA-mRNA-Interaktion zu bedienen und ihre Ergebnisse bei der experimentellen Validierung zu integrieren. Letztendlich bleibt die Identifikation valider microRNA-mRNA Interaktionen eine Herausforderung, die durch den zukünftigen Fortschritt experimenteller und computergestützter Methoden erleichtert werden könnte [143].

Mir-148a-3p als Auslöser-unabhängiger Biomarker für das akut-auf-chronische Leberversagen

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Serumspiegel von *mir-148a-3p* (Sequenz: 5'-UCAGUGCACUACAGAACUUUGU-3') bei Patienten mit ACLF erhöht sind [141]. Dieser Unterschied war sowohl im Vergleich zu gesunden Probanden als auch im Vergleich zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose signifikant.

Mir-148a-3p ist Bestandteil der microRNA-148/152 Familie, zu der außerdem noch *mir-148b* und *mir-152* gehören. Mitglieder der microRNA-148/152 Familie sind an der Regulation von zahlreichen biologischen Prozessen wie chronischer Inflammation, Autoimmunerkrankungen und Karzinogenese beteiligt [30,53]. In einer Arbeit von Farid *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Expression von *mir-148a-3p* bei lebertransplantierten Patienten in der Phase einer Leberschädigung erhöht ist: Die Serumlevel von *mir-148a-3p* korrelierten positiv mit denen der Aspartat- und Alanin-Aminotransferase [45]. Dies unterstützt die auch in dieser Arbeit beobachtete positive Korrelation zwischen dem Serumlevel von *mir-148a-3p* und den Aktivitäten der Aspartat- und Alanin-Aminotransferase, welche das Signifikanzniveau jedoch knapp verfehlte. Eine mögliche Erklärung für die fehlende Signifikanz dieses Ergebnisses ist die Gruppengröße: so lagen in dieser Arbeit die Serumwerte der Aspartat- und Alanin-Aminotransferase nur bei 26 (ASAT) und 31 (ALAT) Patienten vor, wohingegen Farid *et al.* 80 Proben untersuchten [45].

Ferner ergab sich in der vorliegenden Arbeit ein positiver Zusammenhang zwischen dem ACLF-Grad und dem Serumlevel von *mir-148a-3p*. So wiesen die Patienten mit ACLF-Grad II durchschnittlich dreifach höhere Serumlevel von *mir-148a-3p* auf als die Patienten mit ACLF-Grad I. Diese Beobachtung liefert einen Ansatz, um vom *mir-148a-3p*-Serumlevel auf die Krankheitsschwere zu schließen, und so schwere Verläufe zu identifizieren. In einer Arbeit von Claria und Stauber *et al.* wurde gezeigt, dass auch die Intensität der systemischen Inflammation von ACLF Grad I zu II und III zunimmt: mit ansteigendem Schweregrad des ACLF stiegen auch die Plasmaspiegel von IL-6, IL-8 und IL-1ra an. Eine Arbeit von Huang *et al.* zeigte, dass *mir-148a-3p* inflammatorische Prozesse verstärkt, indem sie zu einer vermehrten Differenzierung von Makrophagen in den proinflammatorischen M1-Phänotyp führt und ihre phagozytische Aktivität erhöht [64]. Insbesondere konnte die Autoren zeigen, dass *mir-148a-3p* inflammatorische Prozesse unter LPS/IFN- γ -Stimulation moduliert und *mir-148a-3p*-überexprimierende Makrophagen vermehrt zum M1-Phänotyp differenzieren [64]. In Zusammenschau dieser Beobachtungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass *mir-148a-3p* über die Regulation inflammatorischer Prozesse am Krankheitsverlauf des ACLF beteiligt ist. Diese Hypothese wird auch durch die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung dieser Arbeit (6.2) gestützt, die zeigte, dass Mäuse mit ACLF ein intrahepatisches inflammatorisches Genexpressionsmuster aufweisen.

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass die Serumspiegel von *mir-148a-3p* unabhängig davon erhöht waren, ob das ACLF durch eine bakterielle Infektion oder ein anderes Ereignis ausgelöst wurde. Dies weist darauf hin, dass die systemische Inflammation des ACLF sowohl durch eine Infektion (über Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) als auch durch eine sterile Entzündung (über Damage-associated molecular patterns, DAMPs) unterhalten werden kann [133]. Folglich könnte *mir-148a-3p* ein Auslöser-unabhängiger Biomarker des ACLF sein. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, weil bei circa 44 % der Patienten mit ACLF kein auslösendes Ereignis identifiziert werden konnte [99].

Zusätzlich war es uns möglich zu zeigen, dass auch Patienten mit Leberzirrhose und einer akuten bakteriellen Infektion erhöhte Serumspiegel von *mir-148a-3p* im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen Leberzirrhose aufweisen, wobei die Erhöhung der Serumspiegel von *mir-148a-3p* geringer als bei den ACLF-Patienten ausfiel. Jalan *et al.* beschreiben in ihrem Positionspapier für Patienten mit Leberzirrhose und einer akuten bakteriellen Infektion zwei unterschiedliche Verläufe: Einige Patienten haben eine „einfache“ dekompensierte Leberzirrhose, wohingegen die anderen ACLF entwickeln und entsprechend höhere Mortalitätsraten aufweisen. Auch hier wird die systemische Inflammation mit direkter Organschädigung als treibender Mechanismus der ACLF-Auslösung vermutet. Die Autoren heben hervor, dass insbesondere für die Patienten die ACLF entwickeln neue Biomarker benötigt werden [72]. Da etablierte Entzündungsmarker, wie CRP und Leukozyten, bei Patienten mit Zirrhose weniger verlässlich als bei Patienten ohne Zirrhose sind [39,106]. In dieser Arbeit hatten die Patienten mit Leberzirrhose und einer akuten bakteriellen Infektion im Vergleich zu denen mit einer stabilen Leberzirrhose zwar erhöhte Entzündungsmarker (CRP und Leukozyten), jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen könnte *mir-148a-3p* als prädiktiver Biomarker die Entwicklung eines ACLF anzeigen. Diese Hypothese muss jedoch im Rahmen von prospektiven Studien untersucht werden.

Die unter 6.6.4 dargestellten Überlebenszeitanalysen zeigten, dass der Serumlevel von *mir-148a-3p* keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von ACLF-Patienten zu haben scheint. Wichtig hierbei ist, dass nur für 28 ACLF-Patienten Follow-Up Daten bezüglich des Überlebens vorlagen. Zudem handelt es sich hierbei um eine explorative Datenanalyse, da es nicht ursprüngliches Ziel dieser Arbeit war, einen Zusammenhang von microRNAs und der Überlebenswahrscheinlichkeit von ACLF-Patienten zu belegen. Dennoch

sollte der Einfluss von *mir-148a-3p* bei zukünftigen Arbeiten zur Überlebenswahrscheinlichkeit von ACLF-Patienten berücksichtigt werden. Denn zum Einen konnte in dieser Arbeit ein starker Zusammenhang zwischen dem Serumlevel vom *mir-148a-3p* und ACLF nachgewiesen werden, zum Anderen wurde bereits der Zusammenhang von microRNAs und der Überlebenswahrscheinlichkeit von ACLF-Patienten in der Literatur beschrieben. So zeigten Cisilotto *et al.*, dass verringerte Serumspiegel von *mir-25-3p* mit einer erhöhten 30-Tage-Mortalität bei ACLF-Patienten assoziiert sind [31].

Abschließend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Serumspiegel von *mir-148a-3p* beim ACLF erhöht sind, mit der Krankheitsschwere korrelieren und gegebenenfalls auch prädiktives Potential haben könnten. Die genaue Rolle von *mir-148a-3p* beim ACLF soll in zukünftigen Arbeiten charakterisiert werden.

Der Serumspiegel von *let-7b-5p* ist bei Patienten mit Leberzirrhose erniedrigt

Als Nebenergebnis wurde in dieser Arbeit festgestellt, dass der Serumspiegel von *let-7b-5p* sowohl bei Patienten mit stabiler Leberzirrhose als auch bei Patienten mit Zirrhose und bakterieller Infektion im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt war. *Let-7b-5p* gehört mit elf weiteren microRNAs zur *let-7-Familie* im Menschen [112]. Die microRNAs der *let-7-Familie* gehören zu den ersten beschriebenen microRNAs und wurden erstmalig als Regulatoren beim Wachstum des Fadenwurm *C. elegans* identifiziert. Sie sind jedoch biologisch über viele Spezies konserviert und spielen auch bei Säugetieren eine wichtige Rolle, sowohl bei der Zellproliferation als auch als Tumorsuppressor [85]. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnten Matsuura *et al.* eine umgekehrte Korrelation zwischen dem Serumlevel von microRNAs der *let-7-Familie* und dem Schweregrad der Leberfibrose bei Patienten mit chronischer Hepatitis C zeigen [93]. In einer weiteren Arbeit derselben Autoren konnte diese Beobachtung für *let-7a-5p* an 84 Patienten validiert werden [94]. In dieser Arbeit konnte nun an 52 Patienten gezeigt werden, dass auch die Serumspiegel von *let-7b-5p* bei Leberzirrhose erniedrigt sind, was die Ergebnisse von Matsuura *et al.* unterstützt.

Erkenntnis und Ausblick

Das Hauptresultat der Untersuchungen ist, dass die Serumspiegel von *hsa-mir-148a-3p* bei Patienten mit akut-auf-chronischem Leberversagen erhöht sind. Diese Erhöhung erreichte sowohl im Vergleich zu gesunde Probanden als auch zu Patienten mit stabiler Leberzirrhose statistische Signifikanz. Seit dem die CANONIC-Studie im Jahre 2013 eine in Europa einheitlich gebrauchte Definition des akut-auf-chronischen Leberversagens geliefert hat, haben sich zahlreiche Forschungsarbeiten mit diesem Krankheitsbild beschäftigt [99]. Leider stellt das akut-auf-chronische Leberversagen bis heute aufgrund seiner hohen Kurzzeitmortalität und des dynamischen Krankheitsverlaufes eine große diagnostische und therapeutische Herausforderung dar [65,133]. Die vorliegende Arbeit deutet darauf hin, dass die im Serum zirkulierenden microRNA *hsa-mir-148a-3p* als früher diagnostischer Marker für das akut-auf-chronische Leberversagen dienen kann. Dieses Potential sollte in zukünftigen prospektiven Studien berücksichtigt werden, denn mittels zuverlässiger und schneller Diagnose verbessert sich die Behandlungsqualität des akut-auf-chronischen Leberversagens [6].

Die tierexperimentellen Studien dieser Arbeit konnten zeigen, dass Versuchstiere mit akut-auf-chronischem Leberschaden ein spezifisches intrahepatisches Genexpressionsmuster aufweisen, welches sich von dem in Tieren mit einem isolierten akuten oder chronischen Leberschaden unterscheidet. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen werden die besonderen Charakteristika des akut-auf-chronischen Leberversagen deutlich, bei denen sich die Eigenschaften des Ganzen (akut-auf-chronisches Leberversagen) nicht gänzlich aus den Eigenschaften seiner Teile (akutes und chronisches Leberversagen) erklären lassen.

Es wurden 145 Gene identifiziert, welche das akut-auf-chronische Leberversagen vom gesunden Normalzustand, dem akuten und dem chronischen Leberversagen unterscheiden und somit die molekularen Grundlagen für dieses eigenständige Krankheitsbild bilden. Ein Großteil dieser Gene kodiert für Proteine, welche an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, wodurch deutlich wird, dass Inflammation ein zentrales Charakteristikum des akut-auf-chronischen Leberversagens darstellt. Folglich stärkt auch diese Arbeit die aktuell favorisierte „Systemic Inflammation Hypothesis“ (SIH) [10,15].

Letztendlich konnte die Arbeit mittels eines translationalen Ansatzes Einblicke in die molekularen Grundlagen des akut-auf-chronischen Leberversagens/-schadens auf microRNA- und mRNA-Ebene liefern. Hinter den relevanten Beobachtungen dieser Arbeit (zirkulierende

hsa-mir-148a-3p im humanen Serum, DEGs und inflammatorische microRNAs in den tierexperimentellen Versuchen) liegen biologische Mechanismen, die in der Zukunft weiter entschlüsselt werden müssen.

Zu konkreten weiteren Fragestellungen, welche sich aus dieser Arbeit ableiten, wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits Folgeexperimente entworfen. Aktuell wird an der experimentellen Validierung von Zielgenen der microRNA *mir-148a-3p* in primären Hepatozyten unter ACLF-Bedingungen gearbeitet, um die nachgeschalteten Mechanismen besser zu verstehen. Ziel dieser Untersuchungen ist es, molekulare Ziele von *mir-148a-3p* zu identifizieren, um hieraus Therapieansätze zu erschließen. Zukünftig sollen ein ACLF-Mausmodell mit erhöhter und verminderter Expression von *mir-148a-3p* etabliert werden und der Einfluss der Expression von *mir-148a-3p* auf das akut-auf-chronische Leberversagen untersucht werden. Darüber hinaus sollen die Serumspiegel von *mir-148a-3p* in einer prospektiven Studie an ACLF-Patienten untersucht werden, wobei hier insbesondere auf den Zusammenhang zwischen dem Serumspiegel von *mir-148a-3p*, der Dynamik des Krankheitsbildes und der Mortalität geachtet werden soll. Kritisch bleibt auch zu betrachten, dass in dieser Arbeit keine Patientenkohorte mit fulminanter bakterieller Infektion ohne Leberschaden (z.B. Sepsis-Patienten) hinsichtlich der Serumspiegel von *hsa-mir-148a-3p* untersucht wurde. Eine solche Vergleichsgruppe könnte zeigen, ob *mir-148a-3p* nur bei der systemischen Inflammation beim akut-auf-chronischen Leberversagen verändert reguliert wird oder auch bei systemischer Inflammation ohne Leberschaden. Allgemein haben microRNAs aufgrund ihrer Robustheit und ihrer Eigenschaft, Netzwerke von Genen innerhalb von biologischen Prozessen zu kontrollieren, großes diagnostisches und therapeutisches Potential, welches in Zukunft weiter untersucht werden muss. Im Fall des akut-auf-chronischen Leberversagens konnte diese Arbeit mit der Identifikation von *mir-148a-3p* einen Grundstein zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen dieses Krankheitsbildes legen.

8 Literaturverzeichnis

1. Abbas Z, Shazi L (2015) Pattern and profile of chronic liver disease in acute on chronic liver failure. *Hepatology* 61:366–372
2. Ableitner O (2018) Einführung in die Molekularbiologie. Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden
3. Agilent Technologies (2017) Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide. 4
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124:783–801
5. Albillos A, Lario M, Álvarez-Mon M (2014) Cirrhosis-associated immune dysfunction: Distinctive features and clinical relevance. *J Hepatol* 61:1385–1396
6. Angeli P, Bernardi M, Villanueva C, Francoz C, Mookerjee RP, Trebicka J, Krag A, Laleman W, Gines P (2018) EASL Clinical Practice Guidelines for the management of patients with decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 69:406–460
7. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. 20
8. Arroyo V, Moreau R, Jalan R, Ginès P (2015) Acute-on-chronic liver failure: A new syndrome that will re-classify cirrhosis. *J Hepatol* 62:S131–S143
9. Arroyo V, Moreau R, Jalan R (2020) Acute-on-Chronic Liver Failure. *N Engl J Med* 382:2137–2145
10. Arroyo V, Angeli P, Moreau R, Jalan R, Clària J, Trebicka J, Fernández J, Gustot T, Caraceni P, Bernardi M (2021) The systemic inflammation hypothesis: Towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis. *J Hepatol* 74:670–685
11. Babbs C, Haboubi NY, Mellor JM, Smith A, Rowan BP, Warnes TW (1990) Endothelial cell transformation in primary biliary cirrhosis: A morphological and biochemical study. *Hepatology* 11:723–729
12. Backes C, Meese E, Keller A (2016) Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Mol Diagn Ther* 20:509–518
13. Bahr MJ, Manns MP (1999) Leberzirrhose. *Internist* 40:1308–1322
14. Bartel DP (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136:215–233
15. Bernardi M, Moreau R, Angeli P, Schnabl B, Arroyo V (2015) Mechanisms of decompensation and organ failure in cirrhosis: From peripheral arterial vasodilation to systemic inflammation hypothesis. *J Hepatol* 63:1272–1284
16. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla D-C, Roudot-Thoraval F (2013) The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. *J Hepatol* 58:593–608
17. Blaya D, Pose E, Coll M, Lozano JJ, Graupera I, Schierwagen R, Jansen C, Castro P, Fernandez S, Sidorova J, Vasa-Nicotera M, Solà E, Caballería J, Trebicka J, Ginès P, Sancho-Bru P (2021) Profiling circulating microRNAs in patients with cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *JHEP Rep* 3:100233
18. Blog R-S (2015) StatQuest: PCA clearly explained | RNA-Seq Blog. URL: <https://www.rna-seqblog.com/statquest-pca-clearly-explained/>
19. Bolognesi M (2014) Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. *World J Gastroenterol* 20:2555
20. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD, Kreisel D, Krupnick AS, Srivastava A, Swanson PE, Green JM, Hotchkiss RS (2011) Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. *JAMA* 306:2594
21. Boubaker G, Stempel S, Hemphill A, Müller N, Wang J, Gottstein B, Spiliotis M (2020) Regulation of hepatic microRNAs in response to early stage *Echinococcus multilocularis* egg

- infection in C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0007640
22. Braillon A (2019) Laennec's cirrhosis. *The Lancet* 393:131–132
 23. Bryant CD (2011) The blessings and curses of C57BL/6 substrains in mouse genetic studies. *Ann N Y Acad Sci* 1245:31–33
 24. Cai C, Chen D-Z, Tu H-X, Chen W-K, Ge L-C, Fu T-T, Tao Y, Ye S-S, Li J, Lin Z, Wang X-D, Xu L-M, Chen Y-P (2021) MicroRNA-29c Acting on FOS Plays a Significant Role in Nonalcoholic Steatohepatitis Through the Interleukin-17 Signaling Pathway. *Front Physiol* 12:597449
 25. Cai Q, Liu W, Zhu M, Sheng J (2019) Microbial Infections as a Trigger for Acute-on-Chronic Liver Failure: A Review. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 25:4773–4783
 26. Caldwell S, Marchesini G (2018) Cryptogenic vs. NASH-cirrhosis: The rose exists well before its name.... *J Hepatol* 68:391–392
 27. Caldwell SH, Lee VD, Kleiner DE, Al-Osaimi AMS, Argo CK, Northup PG, Berg CL (2009) NASH and cryptogenic cirrhosis: A histological analysis††Financial Support/Grants: This research supported in part by the Intramural Research Program of the NIH, National Cancer Institute. *Ann Hepatol* 8:346–352
 28. Carbon, Seth, Mungall, Chris (2018) Gene Ontology Data Archive. ZenodoURL: <https://zenodo.org/record/7504797>
 29. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang C-Y (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18:997–1006
 30. Chen Y, Song Y-X, Wang Z-N (2013) The MicroRNA-148/152 Family: Multi-faceted Players. *Mol Cancer* 12:43
 31. Csilotto J, do Amaral AE, Rosolen D, Rode MP, Silva AH, Winter E, da Silva TE, Fischer J, Matiollo C, Rateke EC de M, Narciso-Schiavon JL, Schiavon L de L, Creczynski-Pasa TB (2020) MicroRNA profiles in serum samples from Acute-On-Chronic Liver Failure patients and miR-25-3p as a potential biomarker for survival prediction. *Sci Rep* 10:100
 32. Clària J, Arroyo V, Moreau R (2016) The Acute-on-Chronic Liver Failure Syndrome, or When the Innate Immune System Goes Astray. *J Immunol* 197:3755–3761
 33. Clària J, Stauber RE, Coenraad MJ, Moreau R, Jalan R, Pavesi M, Amorós À, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Oetl K, Morales-Ruiz M, Angeli P, Domenicali M, Alessandria C, Gerbes A, Wendon J, Nevens F, Trebicka J, Laleman W, Saliba F, Welzel TM, Albillos A, Gustot T, Benten D, Durand F, Ginès P, Bernardi M, Arroyo V, for the CANONIC Study Investigators of the EASL-CLIF Consortium and the European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure (EF-CLIF) (2016) Systemic inflammation in decompensated cirrhosis: Characterization and role in acute-on-chronic liver failure: Clària, Stauber et al. *Hepatology* 64:1249–1264
 34. Cohen J (1988) *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed edition. L. Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J
 35. Cohen J (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885–891
 36. Communications E Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. URL: https://eref.thieme.de/ebooks/2472113#/ebook_2472113_SL92426162
 37. D S, Nh A (2008) Liver cirrhosis. *Lancet Lond Engl* 371:
 38. Desmet VJ, Roskams T (2004) Cirrhosis reversal: a duel between dogma and myth. *J Hepatol* 40:860–867
 39. Deutsch M, Manolakopoulos S, Andreadis I, Giannaris M, Kontos G, Kranidioti H, Pirounaki M, Koskinas J (2018) Bacterial infections in patients with liver cirrhosis: clinical characteristics and the role of C-reactive protein. *Ann Gastroenterol* 31:77–83
 40. Ding L, Ai D, Wu R, Zhang T, Jing L, Lu J, Zhong L (2016) Identification of the differential expression of serum microRNA in type 2 diabetes. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:461–465

41. Doi H, Iyer TK, Carpenter E, Li H, Chang K-M, Vonderheide RH, Kaplan DE (2012) Dysfunctional B-cell activation in cirrhosis resulting from hepatitis C infection associated with disappearance of CD27-Positive B-cell population. *Hepatology* 55:709–719
42. Duffin JM (1987) Why does cirrhosis belong to Laennec? *137*:4
43. Eddy SR (2001) Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2:919–929
44. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188–200
45. Farid WRR, Pan Q, van der Meer AJP, de Ruiter PE, Ramakrishnaiah V, de Jonge J, Kwekkeboom J, Janssen HLA, Metselaar HJ, Tilanus HW, Kazemier G, van der Laan LJW (2012) Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transpl* 18:290–297
46. Fernández J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodés J (2002) Bacterial infections in cirrhosis: Epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 35:140–148
47. Fernández J, Acevedo J, Castro M, Garcia O, Rodríguez de Lope C, Roca D, Pavesi M, Sola E, Moreira L, Silva A, Seva-Pereira T, Corradi F, Mensa J, Ginès P, Arroyo V (2012) Prevalence and risk factors of infections by multiresistant bacteria in cirrhosis: A prospective study. *Hepatology* 55:1551–1561
48. Fernández J, Acevedo J, Wiest R, Gustot T, Amoros A, Deulofeu C, Reverter E, Martínez J, Saliba F, Jalan R, Welzel T, Pavesi M, Hernández-Tejero M, Ginès P, Arroyo V (2018) Bacterial and fungal infections in acute-on-chronic liver failure: prevalence, characteristics and impact on prognosis. *Gut* 67:1870–1880
49. Fleming KM, Aithal GP, Solaymani-Dodaran M, Card TR, West J (2008) Incidence and prevalence of cirrhosis in the United Kingdom, 1992–2001: A general population-based study. *J Hepatol* 49:732–738
50. Fridrich A, Hazan Y, Moran Y (2019) Too Many False Targets for MicroRNAs: Challenges and Pitfalls in Prediction of miRNA Targets and Their Gene Ontology in Model and Non-model Organisms. *BioEssays* 41:1800169
51. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2008) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19:92–105
52. Friedman SL (2000) Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275:2247–2250
53. Friedrich M, Pracht K, Mashreghi M-F, Jäck H-M, Radbruch A, Seliger B (2017) The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. *Eur J Immunol* 47:2026–2038
54. Gama JFG, Cardoso LM da F, Lagrota-Candido JM, Alves LA (2022) Animal models applied to acute-on-chronic liver failure: Are new models required to understand the human condition? *World J Clin Cases* 10:2687–2699
55. Gerstner N, Kehl T, Lenhof K, Müller A, Mayer C, Eckhart L, Grammes NL, Diener C, Hart M, Hahn O, Walter J, Wyss-Coray T, Meese E, Keller A, Lenhof HP (2020) GeneTrail 3: Advanced high-throughput enrichment analysis. *Nucleic Acids Res* 48:undefined-undefined
56. Gerstner N, Kehl T, Lenhof K, Eckhart L, Schneider L, Stöckel D, Backes C, Meese E, Keller A, Lenhof H-P (2021) GeneTrail: A Framework for the Analysis of High-Throughput Profiles. *Front Mol Biosci* 8:
57. Graupera I, Isus L, Coll M, Pose E, Díaz A, Vallverdú J, Rubio-Tomás T, Martínez-Sánchez C, Huelin P, Llopis M, Solé C, Solà E, Fondevila C, Lozano JJ, Sancho-Bru P, Ginès P, Aloy P (2022) Molecular characterization of chronic liver disease dynamics: From liver fibrosis to acute-on-chronic liver failure. *JHEP Rep* 4:100482
58. Ha M, Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15:509–524
59. Hassan HM, Li J (2022) Prospect of Animal Models for Acute-on-chronic Liver Failure: A

Mini-review. *J Clin Transl Hepatol* 10:995–1003

60. Hernaez R, Solà E, Moreau R, Ginès P (2017) Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut* 66:541–553
61. Herrero C, Hu X, Li WP, Samuels S, Sharif MN, Kotenko S, Ivashkiv LB (2003) Reprogramming of IL-10 Activity and Signaling by IFN- γ . *J Immunol* 171:5034–5041
62. Holzapfel B, Wickert L (2007) Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit* 37:120–126
63. Homann C, Varming K, Høgåsen K, Mollnes TE, Graudal N, Thomsen AC, Garred P (1997) Acquired C3 deficiency in patients with alcoholic cirrhosis predisposes to infection and increased mortality. *Gut* 40:544–549
64. Huang F, Zhao J-L, Wang L, Gao C-C, Liang S-Q, An D-J, Bai J, Chen Y, Han H, Qin H-Y (2017) miR-148a-3p Mediates Notch Signaling to Promote the Differentiation and M1 Activation of Macrophages. *Front Immunol* 8:
65. Hübener P, Braun G, Fuhrmann V (2018) Das akut-auf-chronische Leberversagen als diagnostische und therapeutische Herausforderung der Intensivmedizin. *Med Klin Intensivmed Notfallmedizin* 113:649–657
66. Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12:99–110
67. Irvine KM, Ratnasekera I, Powell EE, Hume DA (2019) Causes and Consequences of Innate Immune Dysfunction in Cirrhosis. *Front Immunol* 10:293
68. Iwakiri Y (2014) Pathophysiology of Portal Hypertension. *Clin Liver Dis* 18:281–291
69. Iwakiri Y, Shah V, Rockey DC (2014) Vascular pathobiology in chronic liver disease and cirrhosis – Current status and future directions. *J Hepatol* 61:912–924
70. Iwasaki A, Medzhitov R (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16:343–353
71. Jalan R, Gines P, Olson JC, Mookerjee RP, Moreau R, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Kamath PS (2012) Acute-on chronic liver failure. *J Hepatol* 57:1336–1348
72. Jalan R, Fernandez J, Wiest R, Schnabl B, Moreau R, Angeli P, Stadlbauer V, Gustot T, Bernardi M, Canton R, Albillos A, Lammert F, Wilmer A, Mookerjee R, Vila J, Garcia-Martinez R, Wendon J, Such J, Cordoba J, Sanyal A, Garcia-Tsao G, Arroyo V, Burroughs A, Ginès P (2014) Bacterial infections in cirrhosis: A position statement based on the EASL Special Conference 2013. *J Hepatol* 60:1310–1324
73. Jenne CN, Kubes P (2013) Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 14:996–1006
74. Jo MH, Shin S, Jung S-R, Kim E, Song J-J, Hohng S (2015) Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol Cell* 59:117–124
75. Jonas S, Izaurralde E (2015) Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* 16:421–433
76. Kabbani A-R, Tergast TL, Manns MP, Maasoumy B (2021) Behandlungsstrategien des akut-auf-chronischen Leberversagens. *Med Klin Intensivmed Notfallmedizin* 116:3–16
77. Karatayli E, Hall RA, Weber SN, Dooley S, Lammert F (2019) Effect of alcohol on the interleukin 6-mediated inflammatory response in a new mouse model of acute-on-chronic liver injury. *Biochim Biophys Acta* 1865:298–307
78. Karatayli E, Weber S, Karatayli S, Tessenyi M, Hall R, Dooley S, Lammert F (2020) Differential hepatic mRNA and miRNA expression patterns in a novel mouse model of bacterial infection related to acute-on-chronic liver injury. *J Hepatol* 73:S494
79. Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460–469
80. Kawasaki T, Kawai T (2014) Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol* 5:461
81. Keller A, Leidinger P, Vogel B, Backes C, ElSharawy A, Galata V, Mueller SC, Marquart S, Schrauder MG, Strick R, Bauer A, Wischhusen J, Beier M, Kohlhaas J, Katus HA, Hoheisel

- J, Franke A, Meder B, Meese E (2014) miRNAs can be generally associated with human pathologies as exemplified for miR-144*. *BMC Med* 12:224
82. Kern F, Aparicio-Puerta E, Li Y, Fehlmann T, Kehl T, Wagner V, Ray K, Ludwig N, Lenhof H-P, Meese E, Keller A (2021) miRTargetLink 2.0—interactive miRNA target gene and target pathway networks. *Nucleic Acids Res* 49:W409–W416
83. Kim S-J, Kang HS, Lee J-H, Park J-H, Jung CH, Bae J-H, Oh B-C, Song D-K, Baek W-K, Im S-S (2015) Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. *Biochem Biophys Res Commun* 458:462–469
84. Kubes P, Mehal WZ (2012) Sterile Inflammation in the Liver. *Gastroenterology* 143:1158–1172
85. Lee H, Han S, Kwon CS, Lee D (2016) Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein Cell* 7:100–113
86. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–854
87. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA (2004) Cytokine Production and Monocyte HLA-DR Expression as Predictors of Outcome for Patients with Community-Acquired Severe Infections. *CLIN DIAGN LAB IMMUNOL* 11:7
88. Liang J, Wei X, Hou W, Wang H, Zhang Q, Gao Y, Du Y (2022) Bioinformatics analyses of potential ACLF biological mechanisms and identification of immune-related hub genes and vital miRNAs. *Sci Rep* 12:14052
89. Link F, Krohn K, Schumann J (2019) Identification of stably expressed housekeeping miRNAs in endothelial cells and macrophages in an inflammatory setting. *Sci Rep* 9:12786
90. Livak KJ Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. 7
91. Martin-Mateos R, Alvarez-Mon M, Albillos A (2019) Dysfunctional Immune Response in Acute-on-Chronic Liver Failure: It Takes Two to Tango. *Front Immunol* 10:973
92. Massey VL, Qin L, Cabezas J, Caballeria J, Sancho-Bru P, Bataller R, Crews FT (2018) TLR7-let-7 Signaling Contributes to Ethanol-Induced Hepatic Inflammatory Response in Mice and in Alcoholic Hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 42:2107–2122
93. Matsuura K, De Giorgi V, Schechterly C, Wang RY, Farci P, Tanaka Y, Alter HJ (2016) Circulating let-7 levels in plasma and extracellular vesicles correlate with hepatic fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 64:732–745
94. Matsuura K, Aizawa N, Enomoto H, Nishiguchi S, Toyoda H, Kumada T, Iio E, Ito K, Ogawa S, Isogawa M, Alter HJ, Tanaka Y (2018) Circulating let-7 Levels in Serum Correlate With the Severity of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Open Forum Infect Dis* 5:ofy268
95. McConnell M, Iwakiri Y (2018) Biology of portal hypertension. *Hepatology* 67:11–23
96. Mezzano G, Juanola A, Cardenas A, Mezey E, Hamilton JP, Pose E, Graupera I, Ginès P, Solà E, Hernaez R (2021) Global burden of disease: acute-on-chronic liver failure, a systematic review and meta-analysis. *Gut* [gutjnl-2020-322161](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322161)
97. Mogensen TH (2009) Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev* 22:240–273
98. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, Murray CJ, Naghavi M (2014) Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med* 12:145
99. Moreau R, Jalan R, Gines P, Pavesi M, Angeli P, Cordoba J, Durand F, Gustot T, Saliba F, Domenicali M, Gerbes A, Wendon J, Alessandria C, Laleman W, Zeuzem S, Trebicka J, Bernardi M, Arroyo V (2013) Acute-on-Chronic Liver Failure Is a Distinct Syndrome That Develops in Patients With Acute Decompensation of Cirrhosis. *Gastroenterology* 144:1426-1437.e9
100. Moreau R, Clària J, Aguilar F, Fenaille F, Lozano JJ, Junot C, Colsch B, Caraceni P, Trebicka J, Pavesi M, Alessandria C, Nevens F, Saliba F, Welzel TM, Albillos A, Gustot T,

- Fernández J, Moreno C, Baldassarre M, Zaccherini G, Piano S, Montagnese S, Vargas V, Genescà J, Solà E, Bernal W, Butin N, Hautbergue T, Cholet S, Castelli F, Jansen C, Steib C, Campion D, Mookerjee R, Rodríguez-Gandía M, Soriano G, Durand F, Benten D, Bañares R, Stauber RE, Gronbaek H, Coenraad MJ, Ginès P, Gerbes A, Jalan R, Bernardi M, Arroyo V, Angeli P, CANONIC Study Investigators of the EASL Clif Consortium, Grifols Chair, European Foundation for the Study of Chronic Liver Failure (EF Clif) (2020) Blood metabolomics uncovers inflammation-associated mitochondrial dysfunction as a potential mechanism underlying ACLF. *J Hepatol* 72:688–701
101. Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A (2016) RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. *Agil Technol*
102. Muñoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledó L, Monserrat J, Sanz E, Hera A de la, Alvarez-Mon M (2005) Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF- α production: First steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 42:411–419
103. NanoDrop Technologies, In (2007) ND-1000 Spectrophotometer V3.5 User's Manual.
104. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 9:402
105. Piccinini AM, Midwood KS (2010) DAMPening Inflammation by Modulating TLR Signalling. *Mediators Inflamm* 2010:672395
106. Pieri G, Agarwal B, Burroughs AK (2014) C-reactive protein and bacterial infection in cirrhosis. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol* 27:113–120
107. Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D (2005) Mdr2 (Abcb4)^{-/-} mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol* 43:1045–1054
108. Porcu E, Sadler MC, Lepik K, Auwerx C, Wood AR, Weihs A, Sleiman MSB, Ribeiro DM, Bandinelli S, Tanaka T, Nauck M, Völker U, Delaneau O, Metspalu A, Teumer A, Frayling T, Santoni FA, Reymond A, Kutalik Z (2021) Differentially expressed genes reflect disease-induced rather than disease-causing changes in the transcriptome. *Nat Commun* 12:5647
109. Rimola A, Soto R, Bory F, Arroyo V, Piera C, Rodes J (1984) Reticuloendothelial System Phagocytic Activity in Cirrhosis and Its Relation to Bacterial Infections and Prognosis. *Hepatology* 4:53–58
110. Rodriguez-Esteban R, Jiang X (2017) Differential gene expression in disease: a comparison between high-throughput studies and the literature. *BMC Med Genomics* 10:59
111. Roh JS, Sohn DH (2018) Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw* 18:e27
112. Roush S, Slack FJ (2008) The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 18:505–516
113. Roux J, González-Porta M, Robinson-Rechavi M (2012) Comparative analysis of human and mouse expression data illuminates tissue-specific evolutionary patterns of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 40:5890–5900
114. Sarin SK, Choudhury A, Sharma MK, Maiwall R, Al Mahtab M, Rahman S, Saigal S, Saraf N, Soin AS, Devarbhavi H, Kim DJ, Dhiman RK, Duseja A, Taneja S, Eapen CE, Goel A, Ning Q, Chen T, Ma K, Duan Z, Yu C, Treeprasertsuk S, Hamid SS, Butt AS, Jafri W, Shukla A, Saraswat V, Tan SS, Sood A, Midha V, Goyal O, Ghazinyan H, Arora A, Hu J, Sahu M, Rao PN, Lee GH, Lim SG, Lesmana LA, Lesmana CR, Shah S, Prasad VGM, Payawal DA, Abbas Z, Dokmeci AK, Sollano JD, Carpio G, Shresta A, Lau GK, Fazal Karim Md, Shiha G, Gani R, Kalista KF, Yuen M-F, Alam S, Khanna R, Sood V, Lal BB, Pamecha V, Jindal A, Rajan V, Arora V, Yokosuka O, Niriella MA, Li H, Qi X, Tanaka A, Mochida S, Chaudhuri DR, Gane E, Win KM, Chen WT, Rela Mohd, Kapoor D, Rastogi A, Kale P, Rastogi A, Sharma CB, Bajpai M, Singh V, Premkumar M, Maharashi S, Olithselvan A, Philips CA, Srivastava A, Yachha SK, Wani ZA, Thapa BR, Saraya A, Shalimar, Kumar A, Wadhawan M, Gupta S, Madan K, Sakhuja P, Vij V, Sharma BC, Garg H, Garg V, Kalal C, Anand L, Vyas T, Mathur

- RP, Kumar G, Jain P, Pasupuleti SSR, Chawla YK, Chowdhury A, Alam S, Song DS, Yang JM, Yoon EL (2019) Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific association for the study of the liver (APASL): an update. *Hepatology* 13:353–390
115. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC, Connor R, Funk K, Kelly C, Kim S, Madej T, Marchler-Bauer A, Lanczycki C, Lathrop S, Lu Z, Thibaud-Nissen F, Murphy T, Phan L, Skripchenko Y, Tse T, Wang J, Williams R, Trawick BW, Pruitt KD, Sherry ST (2021) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 50:D20–D26
116. Sheedy FJ (2015) Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol* 6:
117. Singh H, Pai CG (2015) Defining acute-on-chronic liver failure: East, West or Middle ground? *World J Hepatol* 7:2571–2577
118. Son K, Yu S, Shin W, Han K, Kang K (2018) A Simple Guideline to Assess the Characteristics of RNA-Seq Data. *BioMed Res Int* 2018:1–9
119. Sun Q, Wang B, Li M (2022) MicroRNA-23a-3p targeting of HMGB1 inhibits LPS-induced inflammation in murine macrophages *in vitro*. *Exp Ther Med* 23:1–9
120. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nölchen B, Judmaier G, Huber C (1992) Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 103:264–274
121. Trebicka J, Amoros A, Pitarch C, Titos E, Alcaraz-Quiles J, Schierwagen R, Deulofeu C, Fernandez-Gomez J, Piano S, Caraceni P, Oettl K, Sola E, Laleman W, McNaughtan J, Mookerjee RP, Coenraad MJ, Welzel T, Steib C, Garcia R, Gustot T, Rodriguez Gandia MA, Bañares R, Albillos A, Zeuzem S, Vargas V, Saliba F, Nevens F, Alessandria C, de Gottardi A, Zoller H, Ginès P, Sauerbruch T, Gerbes A, Stauber RE, Bernardi M, Angeli P, Pavesi M, Moreau R, Clària J, Jalan R, Arroyo V (2019) Addressing Profiles of Systemic Inflammation Across the Different Clinical Phenotypes of Acutely Decompensated Cirrhosis. *Front Immunol* 10:476
122. Trebicka J, Fernandez J, Papp M, Caraceni P, Laleman W, Gambino C, Giovo I, Uschner FE, Jimenez C, Mookerjee R, Gustot T, Albillos A, Bañares R, Janicko M, Steib C, Reiberger T, Acevedo J, Gatti P, Bernal W, Zeuzem S, Zipprich A, Piano S, Berg T, Bruns T, Bendtsen F, Coenraad M, Merli M, Stauber R, Zoller H, Ramos JP, Solè C, Soriano G, de Gottardi A, Gronbaek H, Saliba F, Trautwein C, Özdoğan OC, Francque S, Ryder S, Nahon P, Romero-Gomez M, Van Vlierberghe H, Francoz C, Manns M, Garcia E, Tufoni M, Amoros A, Pavesi M, Sanchez C, Curto A, Pitarch C, Putignano A, Moreno E, Shawcross D, Aguilar F, Clària J, Ponzo P, Jansen C, Vitalis Z, Zaccherini G, Balogh B, Vargas V, Montagnese S, Alessandria C, Bernardi M, Ginès P, Jalan R, Moreau R, Angeli P, Arroyo V, Maschmeier M, Semela D, Elkrief L, Elsharkawy A, Tornai T, Tornai I, Altorjay I, Antognoli A, Baldassarre M, Gagliardi M, Bertoli E, Mareso S, Brocca A, Campion D, Saracco GM, Rizzo M, Lehmann J, Pohlmann A, Praktiknjo M, Schierwagen R, Solà E, Amari N, Rodriguez M, Nevens F, Clemente A, Jarcuska P, Gerbes A, Mandorfer M, Welsch C, Ciraci E, Patel V, Ripoll C, Herber A, Horn P, Danielsen KV, Gluud LL, Schaapman J, Riggio O, Rainer F, Moritz JT, Mesquita M, Alvarado-Tapias E, Akpata O, Lykke Eriksen P, Samuel D, Tresson S, Strnad P, Amathieu R, Simón-Talero M, Smits F, van den Ende N, Martinez J, Garcia R, Markwardt D, Ruppel H, Engelmann C (2020) The PREDICT study uncovers three clinical courses of acutely decompensated cirrhosis that have distinct pathophysiology. *J Hepatol* 73:842–854
123. Trebicka J, Fernandez J, Papp M, Caraceni P, Laleman W, Gambino C, Giovo I, Uschner FE, Jansen C, Jimenez C, Mookerjee R, Gustot T, Albillos A, Bañares R, Jarcuska P, Steib C, Reiberger T, Acevedo J, Gatti P, Shawcross DL, Zeuzem S, Zipprich A, Piano S, Berg T, Bruns T, Danielsen KV, Coenraad M, Merli M, Stauber R, Zoller H, Ramos JP, Solé C, Soriano G, de Gottardi A, Gronbaek H, Saliba F, Trautwein C, Kani HT, Francque S, Ryder S, Nahon P, Romero-Gomez M, Van Vlierberghe H, Francoz C, Manns M, Garcia-Lopez E, Tufoni M,

- Amoros A, Pavesi M, Sanchez C, Praktijnjo M, Curto A, Pitarch C, Putignano A, Moreno E, Bernal W, Aguilar F, Clària J, Ponzo P, Vitalis Z, Zaccherini G, Balogh B, Gerbes A, Vargas V, Alessandria C, Bernardi M, Ginès P, Moreau R, Angeli P, Jalan R, Arroyo V, Maschmeier M, Semela D, Elkrief L, Elsharkawy A, Tornai T, Tornai I, Altorjay I, Antognoli A, Baldassarre M, Gagliardi M, Bertoli E, Mareso S, Brocca A, Campion D, Saracco GM, Rizzo M, Lehmann J, Pohlmann A, Brol MJ, Chang J, Schierwagen R, Solà E, Amari N, Rodriguez M, Nevens F, Clemente A, Janicko M, Markwardt D, Mandorfer M, Welsch C, Welzel TM, Ciraci E, Patel V, Ripoll C, Herber A, Horn P, Bendtsen F, Gluud LL, Schaapman J, Riggio O, Rainer F, Moritz JT, Mesquita M, Alvarado-Tapias E, Akpata O, Aamann L, Samuel D, Tresson S, Strnad P, Amathieu R, Simón-Talero M, Smits F, van den Ende N, Martinez J, Garcia R, Rupprechter H, Engelmann C, Özdoğan OC (2021) PREDICT identifies precipitating events associated with the clinical course of acutely decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 74:1097–1108
124. Tsochatzis EA, Bosch J, Burroughs AK (2014) Liver cirrhosis. *The Lancet* 383:1749–1761
125. Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA (2006) Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 364:33–60
126. Vomelová I, Vaničková Z, Šedo A Technical Note Methods of RNA Purification. *All Ways (Should) Lead to Rome*. 55:10
127. Wang L, Kong L, Xu S, Wang X, Huang K, Wang S, Wu J, Wang C, Sun H, Liu K, Meng Q (2022) Isoliquiritigenin-mediated miR-23a-3p inhibition activates PGC-1 α to alleviate alcoholic liver injury. *Phytomedicine* 96:153845
128. Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, Timmer-Stranghöner A, Vidacek D, Siewert E, Bach J, Geier A, Purucker EA, Gressner AM, Matern S, Lammert F (2005) Patients with acute on chronic liver failure display ‘sepsis-like’ immune paralysis. *J Hepatol* 42:195–201
129. Wiegand J, Berg T (2013) The Etiology, Diagnosis and Prevention of Liver Cirrhosis. *Dtsch Aerzteblatt Online*
130. Wlodzimirow KA, Eslami S, Abu-Hanna A, Nieuwoudt M, Chamuleau RAFM (2013) A systematic review on prognostic indicators of acute on chronic liver failure and their predictive value for mortality. *Liver Int* 33:40–52
131. Wu L, Nguyen LH, Zhou K, de Soysa TY, Li L, Miller JB, Tian J, Locker J, Zhang S, Shinoda G, Seligson MT, Zeitels LR, Acharya A, Wang SC, Mendell JT, He X, Nishino J, Morrison SJ, Siegwart DJ, Daley GQ, Shyh-Chang N, Zhu H (2015) Precise let-7 expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *eLife* 4:e09431
132. Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, Hultenby K, Christensson B, Ericzon B-G, Holgersson J, Sumitran-Holgersson S (2003) Capillarization of Hepatic Sinusoid by Liver Endothelial Cell-Reactive Autoantibodies in Patients with Cirrhosis and Chronic Hepatitis. *Am J Pathol* 163:1275–1289
133. Zaccherini G, Weiss E, Moreau R (2021) Acute-on-chronic liver failure: Definitions, pathophysiology and principles of treatment. *JHEP Rep* 3:100176
134. Zatoński WA, Sulkowska U, Mańczuk M, Rehm J, Boffetta P, Lowenfels AB, La Vecchia C (2010) Liver Cirrhosis Mortality in Europe, with Special Attention to Central and Eastern Europe. *Eur Addict Res* 16:193–201
135. Zhang J, Zhou W, Liu Y, Liu T, Li C, Wang L (2018) Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncol Lett* 15:7215–7220
136. Zhang J, Gao J, Lin D, Xiong J, Wang J, Chen J, Lin B, Gao Z (2021) Potential Networks Regulated by MSCs in Acute-On-Chronic Liver Failure: Exosomal miRNAs and Intracellular Target Genes. *Front Genet* 12:
137. Zhang J, Guo J, Yang N, Huang Y, Hu T, Rao C (2022) Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. *Cell Death Dis* 13:1–13
138. (2017) Dynamic monitoring of monocyte HLA-DR expression for the diagnosis, prognosis, and prediction of sepsis. URL:

<https://www.fbscience.com/Landmark/articles/10.2741/4547>

139. (2018) Principal component analysis explained simply. URL: <https://blog.bioturing.com/2018/06/14/principal-component-analysis-explained-simply/>

140. Leberzirrhose - Diagnosedaten der Krankenhäuser Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen. URL: [https://www.gbe-](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gastg&p_aid=75736531&p_sprache=D&p_h)

[bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gastg&p_aid=75736531&p_sprache=D&p_h](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gastg&p_aid=75736531&p_sprache=D&p_h)
[elp=3&p_indnr=550&p_indsp=&p_ityp=H&p_fid=](https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gastg&p_aid=75736531&p_sprache=D&p_h)

141. Score Calculators | EF Clif | European Foundation for the study of chronic liver failure. URL: <https://www.efclif.com/scientific-activity/score-calculators>

142. GeneGlobe Data Analysis Center | NGS & PCR Analysis Tools | GeneGlobe. URL: <https://geneglobe.qiagen.com/de/analyze>

143. Macros in microRNA target identification. URL: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.4161/rna.28649?needAccess=true&role=button>

9 Publikationen

Maximilian Tessenyi, Susanne N. Weber, Senem C Karatayli, Rabea A Hall, Steven Dooley, Frank Lammert, Ersin Karatayli (2023): **Dynamics of liver injury and regeneration in a mouse model of bacterial infection related acute-on-chronic liver injury (BI-ACLI)**, 39. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Zeitschrift für Gastroenterologie, DOI: 10,1055/s-0042-1759984

Maximilian Tessenyi, Susanne N Weber, Matthias Reichert, Senem C Karatayli, Rabea A Hall, Tony Bruns, Sen Qiao, Ulrich Boehm, Steven Dooley, Frank Lammert, Ersin Karatayli (2022): **Circulating miR-148a is a precipitant independent biomarker of acute-on- chronic liver failure (ACLF)**, 38. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Zeitschrift für Gastroenterologie, DOI: 10,1055/s-0041-1740730

Maximilian Tessenyi, Susanne N Weber, Matthias Christian Reichert, Senem C. Karatayli, Rabea Hall, Sen Qiao, Ulrich Boehm, Steven Dooley, Frank Lammert, Ersin Karatayli (2021): **Identification of miRNA148a-3p as a novel non-invasive potential biomarker for bacterial infection-related ACLF**, 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Zeitschrift für Gastroenterologie, DOI: 10,1055/s-0040-1721960

Ersin Karatayli, Susanne N Weber, Senem C. Karatayli, Maximilian Tessenyi, Rabea Hall, Steven Dooley, Frank Lammert (2020): **Differential hepatic mRNA and miRNA expression patterns in a novel mouse model of bacterial infection related to acute-on- chronic liver injury**, EASL: The Digital International Liver Congress, Journal of Hepatology, DOI: 10,1016/S0168-8278(20)31466-5

10 Danksagung

Zuerst gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Frank Lammert für die großzügige Überlassung des Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung und den spannenden wissenschaftlichen Austausch. Herr Professor Lammert hat mich in allen Phasen dieser Arbeit umfassend unterstützt und Freiräume für meine wissenschaftliche Weiterbildung geschaffen, wofür ich sehr dankbar bin.

Mein ausdrücklicher Dank gilt zudem meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. Ersin Karatayli für die exzellente Einführung in die Methodik und die erstklassige Hilfe bei allen Fragen und Problemen. Mir hat die Zusammenarbeit große Freude bereitet und ich konnte viel über wissenschaftliches Arbeiten und Denken lernen, wofür ich mich bedanken möchte.

Bei Frau Dr. rer. nat. Susanne Weber bedanke ich mich für die zielgerichteten Ratschläge und die sehr konstruktive Korrektur dieser Arbeit, welche mir stets den Weg zu dieser Endfassung gezeigt hat. Bei Frau Irina Nowak und Frau Friederike Berghaus möchte ich mich für die großartige Unterstützung beim Erlernen der experimentellen Methoden bedanken.

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. med. Matthias Reichert für die Bereitstellung der humanen Serumproben und die hervorragende Unterstützung bei allen klinischen Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. med. habil. Tony Bruns von der Uniklinik Aachen danke ich für die großzügige Bereitstellung der Serumproben der ACLF-Patienten. Herrn Dr. rer. nat. Qiao Sen vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie danke ich für die Unterstützung bei Durchführung und Analyse der mRNA-Sequenzierung.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mir fortdauernd warmherzig zur Seite steht und mich immer dazu ermutigt hat, meine Träume und Ziele anzupacken.

Besonders möchte ich mich bei meiner Mutter Nicolina Tessenyi und meinem Vater Imre Tessenyi bedanken, die mir immer ihr volles Vertrauen und ihre bedingungslose Unterstützung geschenkt haben. In besonderer Weise ist diese Arbeit meinem Großvater Imre Tessenyi gewidmet, der mich maßgeblich geprägt und dazu motiviert hat, Arzt zu werden.

11 Curriculum vitae

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 23.05.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Professor Dr. med. Frank Lammert

Professor Dr. med. Matthias Glanemann