

Methylierungs- und  
Expressionsuntersuchungen zur Aufklärung  
der molekularen Pathogenese in chronisch  
entzündlichen Darmerkrankungen

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Luzie Bülow geb. Merten

geb. am 06.12.1985 in Bergisch Gladbach

Mainz 2015

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2015



## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>v</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.2 Der humane Gastrointestinaltrakt.....	1
1.2.2 Anatomie und Funktion des Darms.....	1
1.2.3 Histologischer Aufbau des Darms.....	2
1.3 Morbus Crohn .....	5
1.4 Colitis Ulcerosa .....	7
1.5 Epidemiologie und Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	9
1.6 Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	12
1.7 Epigenetik .....	14
1.7.1 Histonmodifikation .....	15
1.7.2 RNA-Interferenz (RNAi) .....	16
1.7.3 DNA-Methylierung .....	16
1.8 Epigenetik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	18
1.8.1 DNA-Methylierung in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	19
1.9 Zielsetzung.....	21
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 Probenentnahme intestinaler Gewebebiopsien .....	22
2.2 Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen von intestinalen Gewebebiopsien	24
2.2.1 DNA-Extraktion aus intestinalelem Gewebe .....	24
2.2.2 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA .....	24
2.2.3 Amplifizierung Bisulfit-behandelter DNA .....	25
2.2.4 Pyrosequenzierung.....	28
2.3 Genomweite Methylierungsuntersuchung mittels Infinium® HumanMethylation 450 BeadChip .....	30
2.4 Expressionsuntersuchung von sechs Kandidatengen in intestinalen Gewebebiopsien .....	31
2.4.1 RNA-Extraktion aus intestinalelem Gewebe .....	31
2.4.2 cDNA-Synthese .....	32
2.4.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	32
2.5 <i>IL17REL</i> -Promoteranalyse .....	34
2.5.1 Generierung der <i>IL17REL</i> -Inserts.....	34
2.5.2 Restriktionsverdau mit XhoI und BglII .....	35
2.5.3 Ligation.....	36
2.5.4 Kultivierung von Bakterien .....	37

2.5.6	Transformation von kompetenten E.coli Zellen .....	38
2.5.7	Sequenzierung der positiven Kolonien.....	39
2.5.8	Kultivierung humaner Colonkarzinom-Zellen.....	41
2.5.9	Passagieren der HCT116 Zellen.....	41
2.5.10	Zellzahlbestimmung.....	41
2.5.11	Transiente Transfektion mit Lipofectamin3000.....	42
2.5.12	Messung der Luciferase Aktivität .....	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1	Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen.....	44
3.1.1	Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen des terminalen Ileum in MC-Patienten .....	45
3.1.2	Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen von Colon-Gewebe in MC-Patienten .....	47
3.1.3	Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen von Colon-Gewebe in CU-Patienten .....	49
3.2	Genomweite Methylierungsuntersuchung von CU Colon-Gewebeproben mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip.....	51
3.3	Selektive Resequenzierung der in der genomweiten Methylierungsanalyse auffälligen Gene mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung im gesamten Probenkollektiv	58
3.4	Validierung des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung der mit dem BeadChip untersuchten Proben .....	64
3.5	Expressionsuntersuchung von sechs Kandidatengenen in intestinalen Gewebebiopsien mittels quantitativer qRT-PCR.....	65
3.5.1	Expressionsanalysen von Gewebeproben des terminalen Ileum von MC-Patienten .....	66
3.5.2	Expressionsanalysen von Gewebeproben des Colon von MC-Patienten .....	68
3.5.3	Expressionsanalysen von Gewebeproben des Colon von CU-Patienten.....	70
3.6	IL17REL-Promoteranalyse mittels Dual-Luciferase-Assay .....	77
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
4.1	Das Patienten- und Kontrollkollektiv .....	79
4.2	Genomweite Methylierungsuntersuchung intestinaler CU Gewebeproben .....	80
4.3	Selektive Resequenzierung der in der genomweiten Analyse differenziell methylierten Gene mittels Bisulfit- Pyrosequenzierung.....	82
4.4	Gene mit aberranter Methylierung in MC- und CU-Patienten .....	83
4.4.1	Mucin 15 ( <i>MUC15</i> ).....	83
4.4.2	Signal transducer and activator of transcription 3 ( <i>STAT3</i> ) .....	85
4.4.3	Serine/Threonine Protein kinase 4 ( <i>STK4</i> ).....	86
4.5	Gene mit aberranter Methylierung und unveränderter Genexpression in MC- und CU-Patienten .....	87
4.5.1	WAS/WASL-interacting protein family, member 1 ( <i>WIPF1</i> ).....	87

4.5.2	BTB and CNC Homology 1 basic leucine zipper transcription factor 2 (BACH2) .....	88
4.6	Gene mit aberranter Methylierung und Genexpression in MC-und CU-Patienten	89
4.6.1	Interleukin 17 receptor E-like ( <i>IL17REL</i> ) .....	89
4.6.2	Mucin 2 ( <i>MUC2</i> ) .....	90
4.6.3	Mucin 6 ( <i>MUC6</i> ) .....	92
4.6.4	Signal transducer and activator of transcription 4 ( <i>STAT4</i> ) .....	93
4.7	Allgemeine Schlussfolgerungen und zukünftige Strategien zur Expressions- und Methylierungsanalyse .....	95
4.8	Funktionelle Charakterisierung der putativen <i>IL17REL</i> -Promoterregion .....	96
4.9	Aktueller Stand und Zukunftsperspektiven bezüglich klinischer Implikationen und Therapien.....	97
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>112</b>
6.1.	Abbildungsverzeichnis.....	112
6.2	Tabellenverzeichnis .....	117
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	121
6.4	Lebenslauf .....	123

## Zusammenfassung

Unter der Bezeichnung chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden zwei Erscheinungsformen, Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC), zusammengefasst. Das Leitsymptom von CED sind chronische Entzündungen des Magen-Darm-Trakts, insbesondere des terminalen Ileums und des Colons. Es wird angenommen, dass eine aberrante Immunantwort auf das intestinale Mikrobiom in einem genetisch prädisponierten Individuum zur Entstehung von CED führt.

Für diese Studie waren genetische und epigenetische Aspekte der Pathogenese von CU und MC von zentralem Interesse. In verschiedenen Assoziationsstudien wurden bereits 163 mit CED assoziierte krankheitsrelevante Gen-Loci identifiziert. Weitere Studien konnten bereits Gene mit Methylierungs- und Expressionsunterschieden in Gewebe oder Blut von CED-Patienten gegenüber Gewebe oder Blut von gesunden Probanden (Kontrollen) nachweisen.

In der vorliegenden Studie wurden entzündliche und nicht-entzündliche Gewebeproben von CU- (Colon) und MC-Patienten (terminales Ileum und Colon) und gesunden Probanden (terminales Ileum und Colon; nicht entzündlich) auf genspezifischer und genomweiter Ebene auf Methylierungs- und Expressionsunterschiede hin untersucht. Im Rahmen der genspezifischen Analysen wurde in vier Genen (*IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*) eine aberrante Methylierung im Vergleich der MC- oder CU-Gewebeproben mit den Kontrollproben detektiert. Die an 24 ausgewählten CU Colon-Proben (NE und E) und Colon Kontrollen durchgeführte genomweite Methylierungsanalyse zeigte aberrante Methylierungsmuster in über 2500 Genen im Vergleich der entzündlichen CU Colon E-Proben mit den Colon-Kontrollproben. Fünf dieser Gene (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*) wurden ausgewählt und die Veränderung der Methylierung an einem größeren Patientenkollektiv mit zusätzlichen Proben von MC-Patienten bestätigt. Zusätzlich zur aberranten Methylierung wurden Expressionsveränderungen der Gene *IL17REL*, *MUC6* und *STAT4* in MC-Patienten sowie des *MUC2*-Gens in CU-Patienten identifiziert.

Da über die transkriptionelle Regulation des *IL17REL*-Gens bisher nur sehr wenig bis gar nichts bekannt ist, wurden weitere Experimente zur Identifizierung und Charakterisierung der putativen *IL17REL*-Promoterregion mittels Dual-Luciferase-

Assay durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten die höchste Aktivität des putativen *IL17REL*-Promoters im Bereich von -806 – -8 bp vor dem Transkriptionsstart. In diesem Bereich liegen auch die in der Methylierungsanalyse untersuchten CpGs. Es ist daher anzunehmen, dass die an diesen CpGs nachgewiesenen Methylierungsveränderungen in CED-Patienten einen Effekt auf die Transkription des *IL17REL*-Gens ausüben.

Die vorliegende Studie lieferte somit weitere wichtige Belege zur Rolle von epigenetischen Modifikationen bei der molekularen Pathogenese und Progression von CED. Die nachgewiesenen Methylierungsveränderungen können neue Wege zur Diagnose und Therapie von CED eröffnen.



## Danksagung

## **1. Einleitung**

### **1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) versteht man eine wiederkehrende oder permanent aktive entzündliche Erkrankung des Gastrointestinaltrakts. Im Allgemeinen werden je nach Lokalisation der Entzündung und mikroskopischem Erscheinungsbild bei der CED zwei verschiedene Erkrankungen unterschieden, Colitis Ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) (Matricon et al. 2010). Die Pathogenese von CED ist bis heute nicht vollständig erforscht; es wird aber angenommen, dass eine aberrante Immunantwort auf das intestinale Mikrobiom in einem genetisch vorbelasteten Individuum zur Entstehung einer CED führt (Ventham et al. 2013).

Um die Unterschiede zwischen dem Erkrankungsbild von Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn besser erklären zu können, ist eine genauere Kenntnis des Gastrointestinaltrakts und vor allem des Dün- und Dickdarms wichtig.

### **1.2 Der humane Gastrointestinaltrakt**

Der Gastrointestinaltrakt ist für die Aufnahme, Spaltung und Resorption lebensnotwendiger Nährstoffe, Elektrolyte und Wasser verantwortlich. Er besteht aus mehreren Organen, wie z.B. dem Ösophagus, Magen, Dünndarm, Colon und dem Darmausgang.

#### **1.2.2 Anatomie und Funktion des Darms**

Die Nahrung wird über den Mund aufgenommen und gelangt über den Ösophagus in den Magen. Dort wird der Speisebrei durch Salzsäure und Pepsin angesäuert (pH 2-3) und zersetzt. Der Dünndarm setzt sich aus dem Duodenum, Jejunum und Ileum zusammen und misst eine Länge von ca. 3,75 m. In ihm wird durch die Freisetzung von Bikarbonat und Enzymen, die Alkalisierung und enzymatische Spaltung der Nahrungsbestandteile ermöglicht. Durch diesen Prozess können die gespalteten Proteine, Kohlenhydrate und Fette durch die Darmschleimhaut im Ileum resorbiert werden. Die letzten 10-15 cm des Ileums, das terminale Ileum,

gehen über die Ileozökalklappe in das Colon über und sind der einzige Darmabschnitt, der in der Lage ist Gallensäure, und Vitamin B12 zu resorbieren (Luscher et al. 2013).

Über das terminale Ileum gelangt der Speisebrei in das Colon, welches in fünf Abschnitte eingeteilt wird: dem Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Colon sigmoideum und dem Rektum. Da die Verdauung und Aufnahme von Nährstoffen an diesem Punkt schon beendet ist, wird im Darm lediglich der Stuhl durch Rückresorption von Wasser und die darin gelösten Elektrolyte weiter eingedickt, mit Schleim versetzt und bis zur Entleerung gespeichert. Im Gegensatz zum Dünndarm beherbergt das Colon weit mehr Bakterien, hauptsächlich *Escherichia coli* (E.coli), Enterokokken, *Bacillus acidophilus* und *Bacillus bifidus*, die das Gleichgewicht der Darmflora aufrechterhalten.

### 1.2.3 Histologischer Aufbau des Darms

Der histologische Aufbau der einzelnen Verdauungsorgane ist im Allgemeinen sehr ähnlich. Die Dünn- und auch die Dickdarmwand setzen sich aus vier verschiedenen Schichten zusammen, der Tunica serosa, Tunica muscularis, Tunica submucosa und der Tunica mucosa (Welsch 2003).

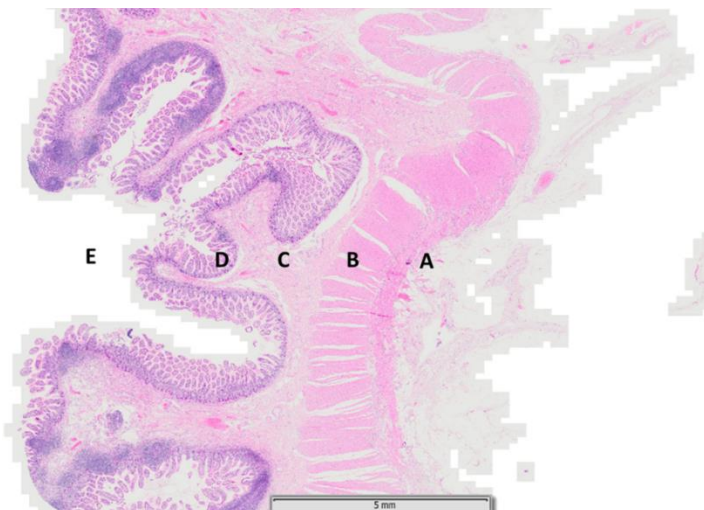


Abbildung 1.1 Histologischer Querschnitt eines Dünndarms. (A) Tunica serosa (B) Tunica muscularis (C) Tunica submucosa (D) Tunica mucosa (von außen nach innen).

Quelle: [http://ds2-pub.unibas.ch/WebDatabaseClient/dbWebViewer.aspx?DBGUID=2edc03ab-ab50-4bc4-b99f-e1d346e45375&DBNAME=OSISconversiontest&ImageGUID=9668635c-5b8e-4e54-887c-56dac6e92755&ImageName=ana-04\\_1-4\\_20090829-025648&NISServerName=ds2-pub.unibas.ch](http://ds2-pub.unibas.ch/WebDatabaseClient/dbWebViewer.aspx?DBGUID=2edc03ab-ab50-4bc4-b99f-e1d346e45375&DBNAME=OSISconversiontest&ImageGUID=9668635c-5b8e-4e54-887c-56dac6e92755&ImageName=ana-04_1-4_20090829-025648&NISServerName=ds2-pub.unibas.ch)

Die äußerste Schicht ist ein einschichtiges Plattenepithel, die Tunica serosa (A) (Abbildung 1.1), gefolgt von der Tunica muscularis (B), bestehend aus einer inneren Ring- und äußeren Längsmuskelschicht, die nicht homogen aufgebaut ist, sondern aus sich überlappenden Ringen besteht, die durch Bindegewebe getrennt sind. Die Tunica muscularis ist in der Lage, zusammen mit endogenen Reflexen die Peristaltik im Darm zu erzeugen. Die Tunica submucosa (C) ist eine Bindegewebsschicht in der viele Blutgefäße, Lymphbahnen und Nerven enden. Zusätzlich sind zahlreiche Brunner-Drüsen vorhanden, die durch ihr alkalisches, bikarbonat-haltiges Sekret den Magensaft neutralisieren und dadurch die Darmschleimhaut zusätzlich schützen. Die Darmschleimhaut (Tunica mucosa) (D) besteht wiederum aus drei verschiedenen Schichten, einer einschichtigen Epitheldecke (Lamina epithelialis mucosae), einer dünnen Bindegewebsschicht (Lamina propria mucosae) und einer Muskelschicht (Lamina muscularis mucosae) (Welsch 2003). Die Tunica mucosa weist im Dünndarm und Dickdarm eine unterschiedliche Morphologie auf und auch die vorhandenen Zelltypen unterscheiden sich leicht.

Charakteristisch für den Dünndarm sind die starken Faltungen der inneren Darmoberfläche und die dadurch entstehenden Zotten und Krypten, die eine Vergrößerung der Darmoberfläche zur Folge haben. Diese s.g. Kerckring-Falten (Plicae circulares) entstehen durch die Ausstülpungen der Tunica mucosa und der Tunica submucosa. Bei den Dünndarmzotten (Villi intestinales) stülpen sich die Lamina propria und das Epithel aus. Die Mikrovilli, der sogenannte „Bürstensaum“, bilden das Mikrorelief der Dünndarmschleimhaut und entstehen durch die Ausstülpung des Zytoplasmas hoch prismatischer Darmzellen, den Enterozyten. Durch die Vergrößerung der Darmoberfläche wird die Resorption von Nährstoffen, Gallensäure und Wasser gesteigert. Die Enterozyten sind durch lateral gelegene Tight junctions miteinander verbunden, bilden dadurch eine Diffusionsbarriere und sind somit für die Aufrechterhaltung der Epithelschicht verantwortlich (Abbildung 1.2) (Antoni et al. 2014).

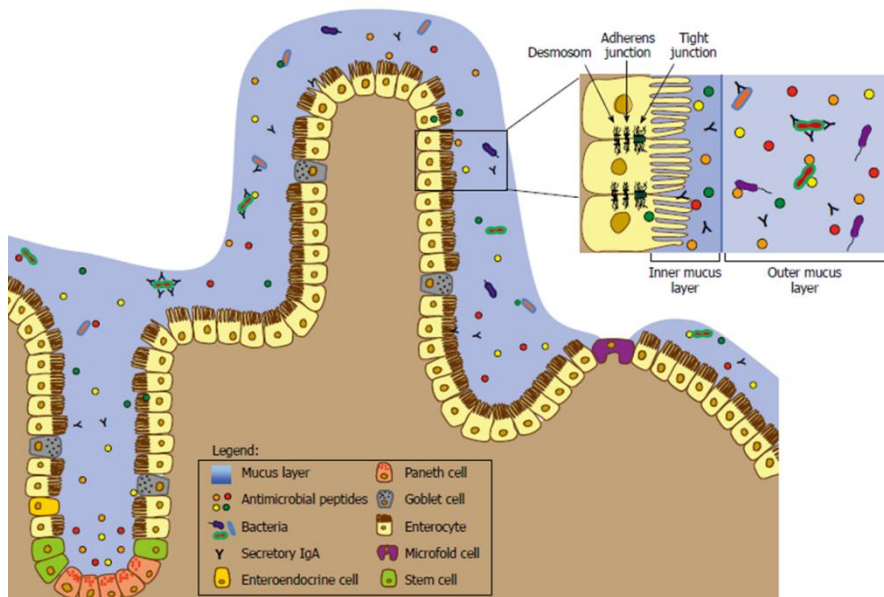


Abbildung 1.2 Verteidigungsmechanismus einer gesunden intestinalen Mucosa-Barriere (Antoni et al. 2014).

Die Darmschleimhaut beherbergt weitere Zellen, wie z.B. die Paneth Zellen, die durch die Absonderung von Defensinen, TNF- $\alpha$  und Lysozymen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Bakterien spielen und somit in die Regulation der Darmflora involviert sind. Verschiedene endokrine Zellen sind für die Produktion von essentiellen Hormonen, wie z.B. Neurotensin, Gastrin, Sekretin und Serotonin verantwortlich und steuern somit die Motilität des Darms.

Die Mucosa des Colons unterscheidet sich im Wesentlichen von der des Dünndarms durch das vollständige Fehlen von Zotten. Charakteristisch sind die Lieberkühn'schen Krypten, die bis zur Lamina muscularis mucosae in die Darmwand hinein reichen. In den Zwischenräumen befinden sich Bindegewebe und Immunzellen, wie Plasmazellen, Lymphozyten und Makrophagen. Zusätzlich ist im Vergleich mit dem Dünndarm die Anzahl der Becherzellen im Colon viel höher. Becher- oder auch Goblet-Zellen genannt, sind Drüsenzellen, die für die Schleimproduktion im Darm zuständig sind und neben einer Schutzschicht auch das Gleiten des Darminhalts gewährleisten.

Die innere Schicht der Darmschleimhaut besteht aus Enterozyten und darin eingebetteten Zellen, den Paneth- und Goblet-Zellen, die durch Tight junctions eng miteinander verbunden sind. Sie bilden eine Barriere, die die darunter liegende Mucosa vor äußeren Einflüssen wie Bakterien und Viren schützt, die eigene Darmflora aber nicht zerstört (Baumgart & Dignass 2002).

### 1.3 Morbus Crohn

Das Krankheitsbild Morbus Crohn (MC) wurde zuerst ausführlich von dem amerikanischen Arzt Burrill Bernard Crohn beschrieben (Crohn et al. 1932). Charakteristisch für MC ist eine schubweise auftretende Entzündung des Gastrointestinaltrakts. Generell können alle Verdauungsorgane betroffen sein, allerdings sind bei Erstdiagnose in 25 % der Patienten nur der Colon, in 28 % nur das terminale Ileum und in 50 % der Colon und das terminale Ileum betroffen. Nur in 3-5 % der Fälle ist der obere Gastrointestinaltrakt, wie z.B. Magen oder Ösophagus, betroffen (Nikolaus & Schreiber 2007). Ein typisches Merkmal für MC ist der segmentale Befall des Darms, d.h. zwischen zwei betroffenen Darmabschnitten gibt es auch entzündungsfreie Areale, auch „Skip-Lesions“ genannt. Die klinischen Symptome sind sehr vielfältig und reichen, je nach betroffenem Areal, von abdominalen Schmerzen bis zu blutigem Durchfall, Fieber und Gewichtsverlust (Tabelle 1.1). Das klinische Erscheinungsbild bei MC wird nach den Montreal-Klassifikationen eingeteilt. Dabei werden sowohl der befallene Bereich des Gastrointestinaltrakts (L1-L4 + P), die Entwicklung und Komplikationen, wie z.B. Stenosen, Abszesse oder Fisteln (B1-B3p) und das Alter bei Erstdiagnose (A1-A3) eingeschlossen (Silverberg et al. 2005).

Tabelle 1.1 Mögliche entzündliche Lokalisationen bei MC und entsprechende Symptome, sowie Montreal-Klassifikationen.

Lokalisation	Montreal-Klassifikation	Klinische Manifestation
Term. Ileum	L1	Abdominale Schmerzen, Gewichtsverlust, Malabsorption, Fieberschübe
Colon	L2	Blutige Durchfälle, Verstopfungen durch Stenosen
Ileocolon	L3	Abdominale Schmerzen, Durchfall, Gewichtsverlust, Fieberschübe
Oberer GI-Trakt	L4	Übelkeit, Stenosen
Perianal	P	Perianale Abszesse, Fisteln

Zu Beginn der Erkrankung sind endoskopisch meist Aphten in der Mucosa zu erkennen, woraus im weiteren Verlauf Ulzera entstehen (Abbildung 1.3). Durch die Ulzera und die ödematöse Mucosa entsteht das für Morbus Crohn typische „Pflastersteinrelief“.



Abbildung 1.3 Hochauflösende Weißlicht-Endoskopie eines schweren Verlauf bei MC mit multiplen Ulzera und spontanen Blutungen der entzündeten Mucosa (Neumann et al. 2012).

Die Entzündung der Darmwand ist meist transmural und kann somit alle Wandschichten betreffen. Die meist langanhaltende Entzündungsreaktion führt in ca. 24 % der MC-Patienten zur Entstehung von Granulomen (Freeman 2007).

Durch die Beteiligung aller Wandschichten einschließlich des umgebenden Gewebes und Vernarbungen ist die Entstehung von Stenosen, Fisteln und Abszessen bei MC sehr häufig (Feagins et al. 2011). Fistelgänge können sich zwischen zwei Darmabschnitten oder auch zwischen dem Darm und anderen Organen wie z.B. der Blase oder der Haut bilden. Meist bilden sich perianale Fisteln schon bevor die Diagnose Morbus Crohn überhaupt gestellt wurde. Stenosen sind meist im Bereich des Dünndarms und vor allem im terminalen Ileum zu finden und mit einer akuten Entzündungsphase assoziiert. MC-Patienten, bei denen das Colon betroffen ist, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einem Colonkarzinom zu erkranken (Scaringi et al. 2013). Darüber hinaus wird diskutiert, ob bei Patienten mit Beteiligung des Ileums die Wahrscheinlichkeit, an einem Dünndarm-Adenokarzinom zu erkranken, erhöht ist (Frank & Shorey 1973; Canavan et al. 2006; Shaukat et al. 2011). Hier spielen vor allem das Alter der Patienten und die Erkrankungsdauer eine große Rolle.

Krankheitskomplizierend können, neben Fisteln auch andere extraintestinale Manifestationen sein, die bei CED im allgemeinen sehr häufig sind (~37 %) (Bernstein et al. 2001). Die extraintestinalen Manifestationen können verschiedene Organe wie die Haut, Augen, Gelenke, Leber und Gallenwege betreffen. Die

häufigsten Erkrankungen der Haut sind Erythema nodosum und Pyroderma gangrenosum, die bei 4 % bzw. 0,75 % aller MC-Patienten auftreten (Farhi et al. 2008). Beide Erkrankungen treten meist unabhängig von einer akuten Entzündung im Darm auf und betreffen häufig die unteren Extremitäten. Ophthalmologische Erkrankungen sind je nach Studie in 4 % bis 12 % der CED-Patienten vertreten, wobei Uveitis und Episkleritis die häufigsten Erkrankungen sind (Bernstein et al. 2001; Taylor et al. 2006). Eine weitere extraintestinale Erkrankung ist die Arthropathie, die in ungefähr 30 % der MC- und UC-Patienten auftreten (Salvarani et al. 2001). Dabei wird in Typ 1- und Typ 2-Arthropathie unterschieden, wobei bei Typ 1 fünf oder weniger meist große Gelenke betroffen sind und bei Typ 2 eine chronische Entzündung von mehr als fünf Gelenken vorliegt (Orchard et al. 1998). Primäre sklerosierende Cholangitis ist die häufigste Erkrankung der Leber und Gallenwege bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Rojas-Feria et al. 2013).

#### **1.4 Colitis Ulcerosa**

Ähnlich wie MC ist eine chronische Entzündung charakteristisch für Colitis Ulcerosa (CU), welche sich allerdings auf den Colon beschränkt. Die Entzündung beginnt meist im Rektum und breitet sich dann im weiteren Verlauf nach proximal aus. Bei Erstdiagnose ist bei 30-50 % der Patienten das Rektum oder das Colon sigmoideum (Distale Colitis; E1) betroffen (Ordás et al. 2012). 20-30 % weisen eine Entzündung im Colon descendens (linkseitige Colitis; E2) und bei rund 20 % der CU Patienten ist der ganze Dickdarm betroffen (Pancolitis; E3). In sehr seltenen Fällen kommt es zu einer Entzündung in den ersten Zentimetern des terminalen Ileum (Refluxileitis, engl. Backwash ileitis) (McCready et al. 1949).

Die klinischen Symptome unterscheiden sich je nach betroffenem Areal und Schwere der Entzündung, aber häufig treten rektale Blutungen, Durchfall und abdominale Schmerzen auf. In schweren Fällen kommt es auch zu Fieberschüben, Anämien und Gewichtsverlust. Ähnlich wie bei MC wird das klinische Erscheinungsbild bei CU nach den Montreal-Klassifikationen eingeteilt. Dabei werden sowohl der befallene Bereich des Colons (E1-E3) als auch die Schwere der Entzündung berücksichtigt (S0-S3) (Satsangi et al. 2006). MC und CU unterscheiden sich in der Art der Entzündung. Bei CU ist die Entzündung des



Colons nicht transmural und beschränkt sich daher auf die Submucosa und Mucosa.

Endoskopisch zeigt die Darmschleimhaut im akuten Schub diffuse Rötungen und ödematöse Schwellungen und neigt zu spontanen Blutungen (Abbildung 1.4). Im Laufe der Erkrankung kann es durch die häufigen Entzündungen zu einer Abflachung des Darmreliefs kommen. In schweren Fällen kommt es zur Ulzeration und der Bildung von Pseudopolypen (Polińska et al. 2011). In ganz seltenen Fällen entwickelt sich ein stark dilatierter toxischer Megacolon mit Perforationsgefahr.

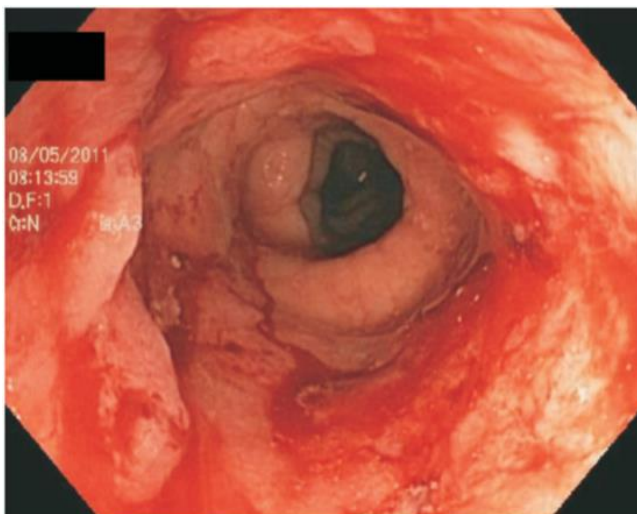


Abbildung 1.4 Hochauflösende Weißlicht-Endoskopie einer schweren Proktitis (CU) mit starken spontanen Blutungen der entzündeten Mucosa (Paine 2014).

Auch bei CU kann es im Krankheitsverlauf zu Komplikationen durch extraintestinale Manifestationen kommen, welche allerdings im Vergleich zu MC seltener sind (Ardizzone et al. 2008). Die einzelnen extraintestinalen Manifestationen können wie bereits beschrieben (Abschnitt 1.3) die Haut, Augen, Gelenke, Leber und Gallenwege betreffen. Patienten mit CU haben ein erhöhtes Risiko, an einem Kolonkarzinom zu erkranken. Daher ist eine engmaschige Kontrolle durch endoskopische Untersuchungen unabdingbar (Yashiro 2014).

Histologisch finden sich in einer akuten Entzündungsphase Granulozyten-Infiltrationen, insbesondere in den Krypten. Im Weiteren kommt es zu einer Atrophie der Schleimhaut und Lymphozyteninfiltration. Häufig sind in diesem Stadium der chronischen Entzündung Epitheldysplasien zu sehen, die eine Vorstufe eines Kolonkarzinoms darstellen können (DeRoche et al. 2014).

## 1.5 Epidemiologie und Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen zeigen in ihrer Inzidenz einen erheblichen geographischen und ethnischen Unterschied. Die Inzidenz von MC und CU steigt seit dem 2. Weltkrieg vor allem in Europa und Nordamerika sukzessive an (Lapidus 2006; Gunesh et al. 2008; Chouraki et al. 2011). Die höchste Inzidenz pro Jahr für CU (0,6-24,3 auf 100000 Einwohnern) wurde in Europa festgestellt, gefolgt von Nordamerika (0-19,2/100000), Asien und dem mittlere Osten (0,1-6,2/100000) (Molodecky et al. 2012). Für MC sieht die Verteilung der Inzidenzen ähnlich aus. Die höchste Inzidenz (0-20,2/100000) wurde in Nordamerika dokumentiert, gefolgt von Europa (0,3-12,7/100000), Asien und dem mittleren Osten (0,04-5/100000). Die Inzidenzen unterliegen starken geographischen Schwankungen. Es scheint einen leichten geschlechter-basierten Unterschied in der Inzidenz von CED, speziell von MC zu geben. Tendenziell erkranken mehr Frauen als Männer an MC (Loftus 2004). UC und MC werden meist im späten Jugendalter oder frühen Erwachsenenalter diagnostiziert.

Basierend auf Studien der letzten Jahrzehnte wird davon ausgegangen, dass die Entstehung von CED multifaktorielle Gründe hat. Im Jahre 1909 wurde zum ersten Mal eine familiäre Häufung von CU beschrieben (Allchin 1909), die in den folgenden Jahren in zahlreichen Publikationen bestätigt wurde (Mayberry et al. 1980; Orholm et al. 1991). Zwillingsstudien in verschiedenen Ländern haben den genetischen Einfluss auf die Pathogenese von CED bestätigt, denn monozygote Zwillingspaare zeigten eine höhere Konkordanz als dizygoten Zwillingspaare (Tysk et al. 1988; Thompson et al. 1996; Spehlmann et al. 2008).

Das erste Suszeptibilitätsgen (*NOD2*) für MC wurde 2001 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert (Ogura et al. 2001; Hugot et al. 2001). Es wird angenommen, dass eine *NOD2* Aktivierung ein Signal in Gang setzt, das eine frühe Immunantwort auf Pathogene zur Folge hat. Wird durch eine Mutation im *NOD2*-Gen die Aktivität reduziert und das Signal zur Immunantwort entfällt, hat das, wie bei MC typisch, eine abnorme adaptive Immunantwort auf mikrobielle Antigene zur Folge (van Heel et al. 2005). Das Risiko, bei Vorliegen einer heterozygoten krankheitsrelevanten Mutation im *NOD2*-Gen, an MC zu erkranken ist zwei bis vier Mal so hoch. Das Risiko bei einer homozygoten oder compound heterozygoten Mutation, bei der sich zwei unterschiedliche Mutationen auf

verschiedenen Allelen befinden, ist sogar 20 bis 40 Mal so hoch wie in Individuen ohne *NOD2*-Mutation (Bonen & Cho 2003). Die Entwicklung neuer Technologien ermöglichte die Durchführung vieler genomweiten Assoziationsstudien (GWAS), die zur Identifikation von beteiligten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in MC und CU führten. Neuesten Studien zufolge wurden bisher 163 Gen-Loci identifiziert, wobei 110 mit MC und CU, 30 mit MC und 23 mit CU assoziiert sind (Jostins et al. 2012) (Abbildung 1.5).

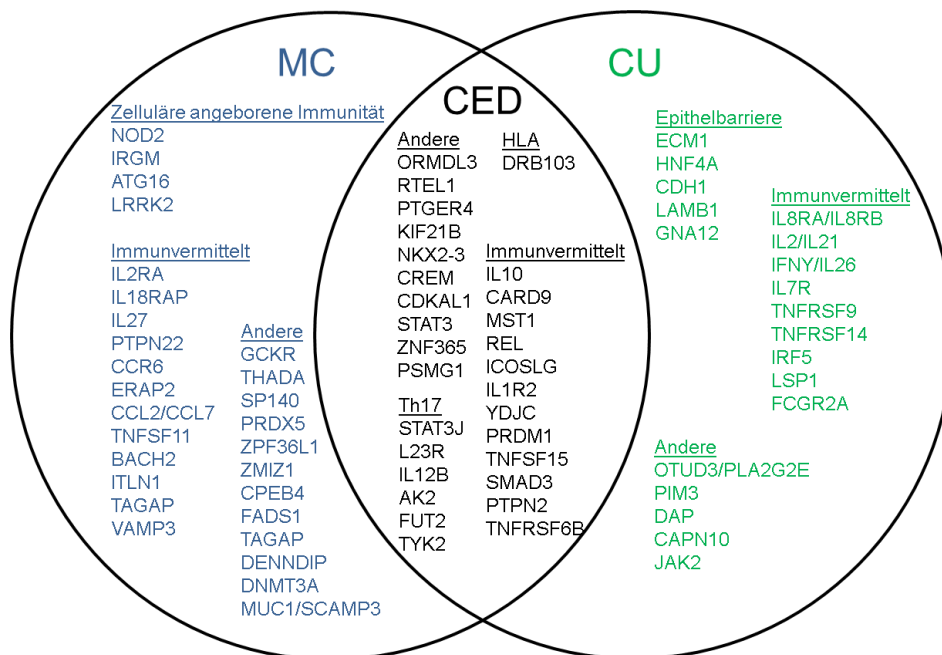


Abbildung 1.5 Verschiedene Gen-Loci die entweder mit CED (schwarz), MC (blau) oder CU (grün) assoziiert sind. Modifiziert nach (Ek et al. 2014).

Die steigenden Inzidenzen für CED können allerdings nicht allein durch die genetische Disposition erklärt werden. Bestehende Umweltfaktoren müssen in der Pathogenese ebenso berücksichtigt werden. Die Pathogenese beeinflussende Umweltfaktoren können z.B. Rauchen, Ernährung, Medikamente, Stress, psychische Faktoren oder die geographische Herkunft sein (Loftus 2004). Rauchen ist eine der meist untersuchten Umweltfaktoren in Bezug auf CED. Studien der letzten 30 Jahre zeigen, dass Rauchen einen protektiven Effekt bei der Entstehung von CU hat (Calkins 1989; Cosnes 2004). Auch der Verlauf der Erkrankung ist bei starken Rauchern meist harmloser und die Anzahl der operationspflichtigen Patienten ist geringer. Ganz anders ist die Auswirkung des Rauchens auf die Entstehung und den Krankheitsverlauf bei MC. Raucher haben ein erhöhtes Risiko an MC zu erkranken als Nicht-Raucher. Auch der Verlauf der

Erkrankung ist meist mit mehr Komplikationen wie z.B. Stenosen und Fisteln assoziiert (Mahid et al. 2007).

Neben den Umweltfaktoren spielt auch die individuelle Darmflora in der Pathogenese von CED eine ausschlaggebende Rolle. Jeder Mensch beherbergt ca. 160 verschiedene Bakterienspezies in seinem Darm, die zusammen die Darmflora bilden (Qin et al. 2013). Obwohl nur etwa 20 % - 30 % der Darmflora kultiviert werden können, konnte der Zusammenhang zwischen CED und einer veränderten Darmflora hergestellt werden. Der Vergleich von gesunden Probanden mit CED-Patienten zeigte eine Verringerung der Biodiversität der Darmflora (Ott et al. 2004). In der Darmflora gesunder Individuen gibt es zwei Bakterien Stämme, Firmicutes und Bacteroidetes, die für die Produktion metabolischer Substrate im Darm eine wichtige Rolle spielen. Im Darm von MC-Patienten ist die Anzahl der Firmicutes und Bacteroidetes sehr viel geringer und andere Stämme wie Enterobakterien sind überrepräsentiert. In CU ist eine Reduzierung von Clostridium Spezies und ein Anstieg von E.coli-Bakterien zu beobachten. Es wird angenommen, dass eine Veränderung der Darmflora während einer Entzündung zu einem metabolischen Ungleichgewicht des komplexen mikrobiotischen Systems führt. Dies hat schwere Folgen für die Barrierefunktion des Darms (Ott et al. 2004).

Da es sich bei CED maßgeblich um einen Entzündungsprozess handelt, ist auch das Immunsystem bei der Pathogenese involviert. Murine und humane Studien haben gezeigt, dass es bei MC zu einer erhöhten Ausschüttung von Th1-Zytokinen durch die Lymphozyten in der Lamina propria kommt was zu einer Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen führt (Cobrin & Abreu 2005). Zusätzlich liegt eine Überreaktion der T-Zellen und B-Zellen auf intestinale Mikroorganismen vor. Dadurch werden im hohen Maße IgG-Antikörper produziert, wodurch Leukozyten angelockt werden, die sekundäre Entzündungsstoffe wie z.B. TNF- $\alpha$  oder Sauerstoffradikale produzieren, was wiederum zu einer Komplement-Aktivierung führt. In letzter Konsequenz hat diese Überreaktion des Immunsystems die Zerstörung der Darmschleimhaut zur Folge, wodurch der Darm seine Barrierefunktion gegen Pathogene und Umwelttoxine verliert. Bei CU liegt ebenfalls eine fehlerhafte Reaktion des Immunsystems vor. Allerdings zeigen Studien der letzten Jahre, dass der Mechanismus, der zur T-Zell-Immunantwort führt, ein anderer ist (Targan & Karp 2005). Es wird angenommen, dass nicht wie

bei MC Th1- sondern Th2-Zytokine und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) die CD4-positiven T-Zellen aktivieren.

Unter Berücksichtigung aller oben genannten Faktoren wird angenommen, dass eine aberrante Immunantwort auf das intestinale Mikrobiom in einem genetisch vorbelasteten Individuum zur Entstehung einer CED führt.

## **1.6 Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen**

Der Schweregrad der Erkrankung wird bei MC in der Regel mit dem Crohn's Disease Activity Index (CDAI) bestimmt, bei dem z.B. die Anzahl der Stuhlgänge pro Tag, Grad der Schmerzen, Gewicht, allgemeine Verfassung und Hämatokrit berücksichtigt werden (Best et al. 1976). Für den Ulcerative Colitis Activity Index (UCDAI) werden unter anderem die Anzahl an Stuhlgängen (Blut/Schleim?) pro Tag, Körpertemperatur, allgemeiner Gesundheitszustand, Puls, Hämoglobin-Wert und die Blutsenkungsreaktion (Walmsley et al. 1998) berücksichtigt.

Das Ziel bei der Therapie von MC und CU ist eine steroid-freie Remission, die Heilung der Mucosa, sowie einer Verringerung der Anzahl der Hospitalisierung und Operationen (Reenaers et al. 2010). Idealerweise sollten die Nebenwirkungen so gering wie möglich und die Anwendung für die Patienten einfach und alltagstauglich sein. Um den Grad der Entzündung zu minimieren und die Lebensqualität der CED Patienten zu erhöhen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Bei leichter bis mittelgradiger Entzündung sowie zur Remissionserhaltung werden 5-Aminosalicylsäure-haltige Medikamente (Mesalazin) wie z.B. Salofalk® eingesetzt. Diese wirken stark entzündungshemmend auf die entzündete Schleimhaut (topisches Wirkprinzip) sind aber gleichzeitig sehr gut verträglich (Regueiro et al. 2006). Im Regelfall wird das Medikament oral verabreicht und entfaltet im terminalen Ileum bzw. im Colon ascendens seine volle Wirkung. Liegt eine Entzündung im Rektum vor, kann Mesalazin auch als Schaum oder Klysmen angewendet werden. Führt die Anwendung von Mesalazin nicht zu einer Verbesserung der Entzündungsschwere, wird in vielen Fällen ein lokal wirkendes Glukokortikoid wie z.B. der Wirkstoff Budenosin (Budenofalk®) oral oder in Form von Schäumen oder Klysmen verabreicht. Glukokortikoide steuern die metabolische Homeostase, insbesondere den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel. Der gewünschte Entzündungs-

hemmende Effekt wird über eine Funktionshemmung der T-Zellen, B-Zellen und myeloiden Zellen sowie weitere Mechanismen vermittelt (Mowat et al. 2011). In höheren Konzentrationen können Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Gewichtszunahme, Wassereinlagerungen, Haarausfall und Kopfschmerzen auftreten. Tritt nach der Gabe von topisch wirkenden Glukokortikoiden keine Remission ein, kann auf systemische Steroide wie z.B. Prednisolon oder Methylprednisolon zurückgegriffen werden, die entweder oral oder in schweren Fällen intravenös verabreicht werden. Um starke Nebenwirkungen zu vermeiden, ist es wichtig, für jeden Patienten individuell die optimale Steroid-Dosierung zu ermitteln, um bei möglichst geringer Dosis den höchsten Effekt zu erzielen. Parallel werden immunsuppressive Medikamente wie z.B. Azathioprin oder 6-Mercaptopurin eingesetzt, die durch die Bildung verschiedener Metabolite die Funktion von Rac1 (GTPase) inhibieren, was zu einer Apoptose von aktivierten T-Zellen führt (de Boer et al. 2007). Anders als Steroide, die nur für die Behandlung eines akuten Schubs eingesetzt werden sollten, können immunsuppressive Medikamente für die Erhaltung der Remission und Heilung der Mukosa über Jahre hinweg eingenommen werden.

In den meisten Fällen kann mit Hilfe von Steroiden eine Remission erzielt werden, in manchen Fällen allerdings reagieren die Patienten nicht auf die Gabe von Steroiden (steroidrefraktär) oder es kommt nach der Remission zu einem erneuten Schub nach Verringerung oder Absetzen der Steroide (steroidabhängig). Für diese Patienten kann eine Behandlung mit Biologika, wie z.B. Infliximab, Natalizumab oder Vedolizumab von Vorteil sein. Diese Medikamente greifen an verschiedenen Punkten der Entzündungskaskade an und führen im optimalen Fall zur Remission. Anders als immunsuppressive Medikamente unterdrücken Biologika nicht das ganze Immunsystem, sondern hemmen sehr selektiv nur bestimmte Bausteine des Immunsystems. Infliximab ist ein Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-Antikörper, der sowohl die freien als auch die membrangebundenen TNF $\alpha$ -Moleküle bindet. Wie schon zuvor beschrieben werden bei CED durch die Überreaktion des Immunsystems vermehrt entzündungsfördernde Stoffe wie TNF $\alpha$  produziert und führen zu einer Störung der Barrierefunktion. Die TNF $\alpha$ -Blocker binden die überschüssigen TNF $\alpha$ -Moleküle und führen somit im besten Fall zu einer Reduktion der Entzündung und zur Heilung der Mukosa (Reinisch et al. 2005; Rutgeerts et al. 2009).

Vendolizumab, blockiert hochselektiv  $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, ein Oberflächen-Adhäsionsmolekül von aktivierten Lymphozyten und verhindert damit das Einwandern von aktiven Lymphozyten ins Darmgewebe, wodurch die Entzündung unterdrückt wird (Soler et al. 2009; Sandborn et al. 2013). Neben den TNF $\alpha$ - und  $\alpha_4\beta_7$ -Blockern gibt es auch noch Interleukin (IL)-Antikörper (anti-IL12, IL13 und IL6), die die Menge dieser entzündungsfördernden Zytokine in der Darmwand reduzieren und eine Entzündungsreduktion bewirken (Rutgeerts et al. 2009). Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen sollten Biologika in der Therapie von MC und CU erst eingesetzt werden, wenn konventionelle Medikationen keine Wirkung zeigen.

Bei Patienten, die trotz Behandlung mit Steroiden, Immunsuppressiva und Biologika eine kontinuierliche Entzündungsaktivität aufweisen, ist eine Operation, bei der betroffene Darmabschnitte entfernt werden, unabdingbar (Langholz 2010). Bei MC kann eine Operation die Symptomatik verbessern, aber nicht zu einer Heilung führen, da wie schon beschrieben, die Entzündung segmental auftritt; d.h., wenn ein betroffener Abschnitt entfernt wurde, kann eine Entzündung an einer anderen Stelle des Darms auftreten. Bei CU-Patienten stellt die Operation eine Möglichkeit der Heilung dar, da die Entzündung immer einen zusammenhängenden Bereich betrifft. Bei 5 % - 50 % aller CU-Patienten ist eine Kolektomie, eine Entfernung des gesamten Colons, die einzige Möglichkeit, die Krankheit adäquat zu behandeln (D'Haens & Ochsenkühn 2011). Bei einem rektalen Befall muss eine Proktokolektomie durchgeführt werden, bei der üblicherweise aus den letzten 30 cm des Dünndarms ein J-förmiges Reservoir gebildet wird (Ileumpouchanal Anastomose (IPAA)). In den schwerwiegendsten Fällen wird der After verschlossen und der Dünndarm als künstlicher Darmausgang ausgeleitet.

## 1.7 Epigenetik

Im Jahre 1942 definierte Conrad Hal Waddington erstmals den Begriff der Epigenetik als „der Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten, die den Phänotyp hervorbringen, untersucht“ (Waddington 1942). Diese Definition wurden in den kommenden Jahren weiter spezifiziert und so befasst sich das Forschungsgebiet der Epigenetik heutzutage mit mitotisch vererbaren, reversiblen Chromosomen-

Modifikationen, die die Expression und Funktion von Genen beeinflussen, ohne dass eine Veränderung der Nukleotidsequenz vorliegt (Feinberg & Tycko 2004). Epigenetische Mechanismen sind wichtig für die Gewebe-spezifische Genregulation, die Entwicklungskontrolle während der Embryogenese und Gametogenese und für die Genregulation im Allgemeinen.

Aktuell sind drei verschiedene genetische Mechanismen bekannt, durch die Aktivierung oder Stilllegung von Genen erfolgen kann; Histon-Modifikationen, RNA-Interferenz und DNA-Methylierung.

### **1.7.1 Histonmodifikation**

Im eukaryotischen Zellkern liegt die DNA in Chromatin zusammengepackt vor. Das Chromatin setzt sich aus Nukleosomen zusammen, die wiederum aus einem Histonkomplex aus basischen Proteinen zusammengesetzt sind. Ein Nukleosom besteht aus einem Oktamer der vier Kernhistone (H3, H4, H2A und H2B), das mit dem „linker“ Histon H1 verbunden ist, um welches 145-147 bp der DNA gewunden sind (D'Anna & Isenberg 1974; Luger et al. 1997).

Posttranslationale Modifikationen sind am häufigsten an den N-Termini von H3-, H4-, H2A- und H2B-Histonen zu beobachten (Kouzarides 2007). In den letzten zehn Jahren wurden unterschiedliche Enzyme identifiziert, die verschiedene Histonmodifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, SUMOylierung, ADP-Ribosylierung, Deaminierung und Prolin-Isomerisierung steuern (Sternier & Berger 2000; Zhang & Reinberg 2001; Hassa et al. 2006; Nathan et al. 2006; Nelson et al. 2006; Shilatifard 2006). Diese verschiedenen Modifikationen können die Aktivität von z.B. Transkriptionsfaktoren und „Histone Chaperons“ durch die Änderung der DNA-Histon-Interaktion beeinflussen. Die Änderung der DNA-Histon-Interaktion kann aktivierende oder reprimierende Wirkung auf die Genexpression haben.

Die am besten charakterisierten Histonmodifikationen sind die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung. Eine Acetylierung der Histone, die ausschließlich an Lysin Bausteinen vorkommt, ist mit einer Aktivierung der Transkription assoziiert (Sternier & Berger 2000). Die Methylierung hingegen kann, je nach Aminosäure (Lysin oder Arginin), Lokalisation und Anzahl der Methylgruppen sowohl eine aktivierende als auch eine reprimierende Wirkung



auf die Transkription haben (Bannister & Kouzarides 2005). Eine Methylierung von H3 Lysin 4 (H3K4) wird z.B. häufig in den Promoterregionen aktiver Gene gefunden und ist somit mit einer erhöhten Transkriptionsrate assoziiert (Cheng et al. 2014). Ubiquitinylierungen werden meist auf H2A und H2B gefunden und können sowohl aktivierende (H2BK120) als auch reprimierende (H2AK119) Wirkung haben (Bonnet et al. 2014). Phosphorylierungen von Serinen bzw. Threoninen haben meist eine Aktivierung der Transkription zur Folge (Baek 2011).

### **1.7.2 RNA-Interferenz (RNAi)**

RNA-Interferenz beschreibt einen hoch konservativen Mechanismus, der für posttranskriptionelles Gen-Silencing in Eukaryoten verantwortlich ist. Durch die Entdeckung der RNAi im Jahre 1998 (Fire et al. 1998) wurde das Verständnis für die Genregulation revolutioniert und seitdem eine Vielzahl weiterer Regulationsmechanismen erforscht, die auf kleinen 20-30 Nukleotid langen nichtkodierenden RNAs (ncRNAs) basieren. Die am besten erforschten ncRNAs sind „small interfering“ RNAs (siRNAs), „micro“ RNAs (miRNAs) und „piwi interacting“ RNAs (piRNAs). In eukaryotischen Zellen haben sie unterschiedliche Funktionen, wie z.B. Abwehr von RNA-Viren, Schutz vor Transposons, Regulation der Expression und posttranskriptionelle Regulation (Carthew & Sontheimer 2009; Malone & Hannon 2009; Siomi et al. 2011).

### **1.7.3 DNA-Methylierung**

DNA-Methylierung wurde sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten beschrieben und ist der am intensivsten erforschte epigenetische Regulationsmechanismus. Ein prominentes Beispiel für DNA-Methylierung ist die X-Inaktivierung in weiblichen Säugern (Barr & Bertram 1949; Lyon 1961), bei der ein Großteil der Gene, die sich auf dem zweiten X-Chromosom befinden, durch Methylierung ausgeschaltet werden (Sharp et al. 2011). Der reprimierende Effekt von methylierten Cytosinen (5mC) kann durch zwei verschiedene Mechanismen vermittelt werden (Ballestar & Wolffe 2001). Einerseits kann durch die Methylierung ein direktes Binden von Transkriptionsfaktoren an die DNA blockiert und damit die Transkription unterbunden werden. Andererseits kann die

Expression eines Gens durch das Binden von „methyl-CpG-binding“-Proteinen an die methylierten CpGs runterreguliert oder das Gen ganz ausgeschaltet werden. Die „methyl-CpG-binding“-Proteine bestehen aus einer „methyl binding“-Domäne und einer „transcription repression“-Domäne, welche die Präsenz von anderen Corepressoren und Histondeacetylasen erhöht. Die daraus resultierende Histondeacetylierung führt zu einer inaktiven Chromatinstruktur und hat damit eine reprimierende Wirkung auf die Transkription (Ballestar & Wolffe 2001).

Der reprimierende Effekt durch DNA-Methylierung ist essentiell für die Initiierung und Aufrechterhaltung genomischer Prägung in Säugern. Im Allgemeinen beschreibt die genomische Prägung das Phänomen, das die Expression von bestimmten Genen, den geprägten Genen, vom parentalen Ursprung abhängig ist. In diesen Fällen wird entweder das maternale oder das paternale Allel exprimiert. Ein bekanntes Beispiel für ein geprägtes Gen ist *H19*, welches maternal unmethyliert und paternal methyliert vorliegt (Robertson 2005). Insgesamt sind mehr als 100 geprägte Gene identifiziert worden, machen aber nur einen kleinen Teil des Genoms aus. Der Verlust der genomischen Prägung verschiedener Gene kann zu unterschiedlichen Imprinting-Erkrankungen, wie z.B. dem Beckwith-Wiedemann Syndrom, sowie dem Prader-Willi Syndrom, Angelman Syndrom und dem Silver-Russel Syndrom führen.

Im Allgemeinen ist die DNA-Methylierung eine chemische Modifikation eines Cytosin-Moleküls, bei der an Position 5 eine Methylgruppe ( $\text{CH}_3$ ) hinzugeführt wird (Singal & Ginder 1999). Die Konversion von Cytosin zu 5-Methylcytosin wird durch spezielle Enzyme, die Methyltransferasen, katalysiert. Die drei wichtigsten Methyltransferasen sind DNMT1, DNMT3A und DNMT3B, welche die Methylgruppe des S-Adenosylmethionin (SAM) Substrats an das Cytosin heften (Yu et al. 2011). DNMT1, die Erhaltungs-Methyltransferase, ist verantwortlich für die Methylierung von hemimethylierten CpGs zur Erhaltung des Methylierungsmusters während der DNA-Replikation (Abbildung 1.6) (Dhe-Paganon et al. 2011). DNMT3A und DNMT3B haben eine hohe Affinität zu unmethylierter DNA und spielen daher eine große Rolle bei der Etablierung von Methylierungsmustern während der Zelldifferenzierung (Bestor 2000).

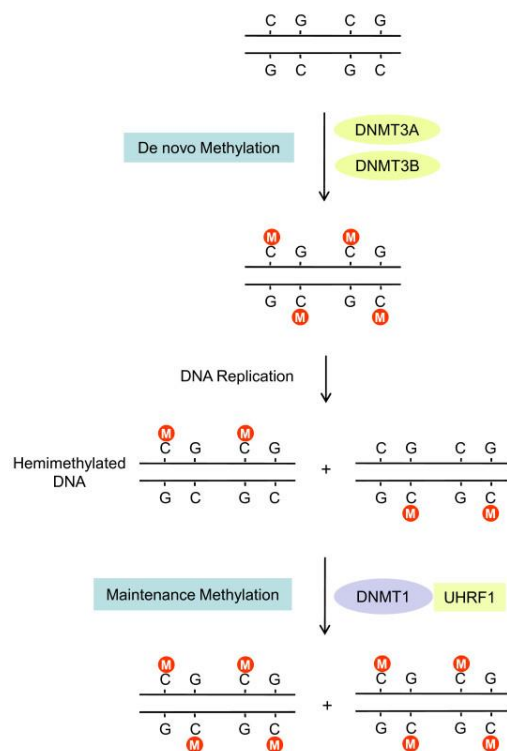


Abbildung 1.6 Schematische Illustration der Wirkungsweise der Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Modifiziert nach (Yu et al. 2011).

Die Veränderung der Expression bestimmter Gene durch eine aberrante Methylierung ist mit einer Vielzahl verschiedener Krankheiten assoziiert. Das bekannteste Beispiel ist Krebs. Erste Theorien, dass Veränderungen im Methylierungsmuster einen direkten Zusammenhang zur Karzinogenese haben, wurden 1979 veröffentlicht (Lapeyre & Becker 1979). In den folgenden Jahren wurde bestätigt, dass in Krebszellen weniger Methylcytosin vorhanden ist als in gesunden Zellen. Es wurde auch gezeigt, dass die Methylierung und damit die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen die Tumorgenese und Metastasierung fördern (Feinberg & Vogelstein 1983; Laird & Jaenisch 1996).

## 1.8 Epigenetik chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Wie schon vorher beschrieben, wird angenommen, dass eine aberrante Immunantwort auf das intestinale Mikrobiom in einem genetisch vorbelasteten Individuum zu der Entstehung einer CED führt. Die Forschung der letzten Jahrzehnte hat allerdings ergeben, dass durch die genetische Komponente nur

etwa 13,6 % der MC- und 7,5 % der CU-Fälle erklärt werden können (Jostins et al. 2012). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es angebracht, die Gen-Umwelt Interaktionen in der Entstehung von CED genauer zu untersuchen (Abbildung 1.7). Epigenetische Faktoren können Interaktionen zwischen der Umwelt und dem Genom vermitteln und deren Untersuchung kann daher neue Erkenntnisse in der Pathogenese von CED liefern (Ventham et al. 2013).

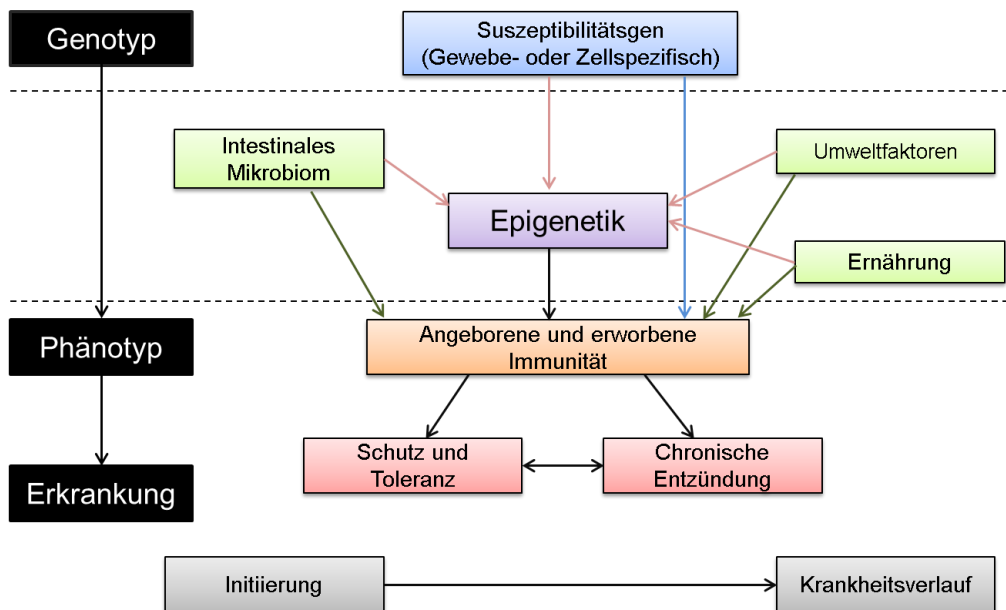


Abbildung 1.7 Rolle der Epigenetik in der Pathogenese von CED. Das klassische Paradigma eines Genotyps, der zu einem Phänotyp und dann zu einer Erkrankung führt, wurde durch die hauptetiologischen Faktoren in CED erweitert. Epigenetik (violett) interagiert mit genetischen Faktoren (blau) und Umweltfaktoren (grün) und beeinflusst das Immunsystem (orange). Durch die Immunantwort wird dann entschieden, ob eine Erkrankung ausgelöst wird oder die Veränderungen toleriert werden. (Renz et al. 2011; Kalla et al. 2014).

### 1.8.1 DNA-Methylierung in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Viele Studien der letzten 20 Jahre beschäftigen sich hauptsächlich mit Veränderungen der DNA Methylierung in CU. Den ersten Hinweis, dass DNA-Methylierung, als epigenetischer Mechanismus in Zusammenhang mit der Pathogenese von CU steht, gab es 1996 (Gloria et al. 1996). Biopsien aus verschiedenen Colon Arealen zeigten im Vergleich zu Biopsien von gesunden Probanden eine signifikante globale Hypomethylierung der DNA. In den nachfolgenden Jahren wurden mehrere Studien veröffentlicht, die genspezifische Methylierungsunterschiede in z.B. *p16*, *MYOD* und *p16INK4a* anhand von Colon Biopsien von Patienten mit Dysplasien identifizierten (Hsieh et al. 1998; Issa et al.

2001; Azarschab et al. 2002). Andere Untersuchungen befassten sich mit den Methylierungsunterschieden in entzündlichen und nicht-entzündlichen Colon Geweben von CU-Patienten oder verschiedenen Darmabschnitten (Rektum vs. terminale Ileum) (Tahara, Shibata, Nakamura, Yamashita, Yoshioka, Okubo, Maruyama, Kamano, Kamiya, Fujita, et al. 2009; Arasaradnam et al. 2010; Saito et al. 2011). Die erste genomweite Studie, die den Methylierungsstatus von Colongewebe von MC- und CU-Patienten mit Kontrollen verglich, wurde im Jahr 2012 veröffentlicht (Cooke et al. 2012). Ausgehend von einer großen Anzahl Gene, die Methylierungsunterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgewebe aufwiesen, wurde bei drei Genen (*FUT7*, *DOK2*, und *TAP1*) der Zusammenhang zwischen Methylierung und Genexpression genauer untersucht und bestätigt. Eine weitere Studie befasste sich mit der Methylierung in Gewebe von CU- und MC-Patienten im Vergleich mit Kontrollen und identifizierte weitere sieben CpG-Loci (Lin et al. 2011).

Neben den Studien, in denen Gewebeproben analysiert wurden, wurden auch Methylierungsstudien an peripheren Blutproben durchgeführt. Eine der ersten Studien verglich die *INFG*-Methylierung von T-Zellen isoliert aus Lamina Propria (LP) und peripherem Blut (PB) von MC- und CU-Patienten mit der Methylierung in T-Zellen gesunder Probanden. Es konnte ein höheres Maß an Methylierung der LP-T-Zellen im Vergleich mit den PB-T-Zellen gemessen werden. Dies traf sowohl auf die der CED-Patienten als auch auf die Kontrollen zu (Gonsky et al. 2009). Weitere Methylierungsstudien wurden an Blutproben von MC- und CU-Patienten sowie Kontrollen durchgeführt. Dabei konnte eine größere Anzahl von krankheitsassoziierten Veränderungen an verschiedenen Genen (z.B. *STAT3*, *STAT4*, *STAT5*, *BCL3*, *IRF5* und *MAPK13*) identifiziert werden (Balasa et al. 2010; Harris et al. 2014; Kim et al. 2012; Lin et al. 2012; Nimmo et al. 2012).

Die oben genannten Studien zeigen, dass DNA-Methylierung im Zusammenhang mit CED im Allgemeinen und in manchen Fällen mit bestimmten klinischen Merkmalen wie z.B. dem Schweregrad der Entzündung oder dem Risiko für Dysplasien steht.

## 1.9 Zielsetzung

Die Entstehung von CED beruht auf einem komplexen Zusammenspiel von genetischen Prädispositionen verschiedener Gene und einer aberranten Immunantwort auf das intestinale Mikrobiom. Da durch die genetische Komponente allerdings nur etwa 1/10 der CED-Fälle erklärt werden können, ist es wichtig Gen-Umwelt-Interaktionen in Form von epigenetischen Veränderungen bei der Entstehung von CED genauer zu untersuchen.

Im Rahmen dieses Projektes sollen epigenetisch regulierte Suszeptibilitätsgene für CED identifiziert werden. Dazu wurden im Vorfeld Gene ausgewählt, die entweder an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Darms beteiligt sind und Expressionsveränderungen in CED-Patienten aufwiesen oder mit CED assoziierte Mutationen zeigten. Die Promotermethylierung dieser Gene soll in entzündlichen und nicht-entzündlichen intestinalen Gewebeproben von CED-Patienten und gesunden Probanden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestimmt werden. Für eine ausgewählte Anzahl Gewebeproben von CU-Patienten und gesunden Probanden sollen genomweite Methylierungsanalysen mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip durchgeführt werden. Um die Auswirkung der identifizierten Methylierungsunterschiede auf die Genexpression zu untersuchen, sollen zudem qRT-PCR-Analysen zur Bestimmung der mRNA-Menge erfolgen.

Langfristiges Ziel dieser Studie ist es, anhand der identifizierten epigenetischen Veränderungen in CED-Kandidatengenen zum besseren molekularen Verständnis der Pathogenese und des Verlaufs von CED beizutragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probenentnahme intestinaler Gewebebiopsien

Die für die oben beschriebene Studie verwendeten Gewebebiopsien wurden während terminierter Koloskopien in der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität von Gastroenterologen entnommen. Es wurden Biopsien von Kontrollindividuen ohne Hinweis auf CED in der Krankengeschichte, von Patienten mit MC und von Patienten mit CU entnommen. Indikationen zur Durchführung einer Koloskopie bei den Kontrollindividuen waren Krebsvorsorgeuntersuchungen, Nachsorgeuntersuchungen nach Entfernung von Karzinomen, Unregelmäßigkeiten im Stuhlgang, abdominale Schmerzen, sowie Blutbeimengungen im Stuhl. Gewebeproben wurden dabei sowohl aus dem terminalen Ileum als auch aus dem Colon entnommen. Da bei MC und CU verschiedene Darmareale betroffen sein können, wurden von MC-Patienten Biopsien des terminalen Ileums und des Colons entnommen und von CU-Patienten nur aus dem Colon. Sofern eine Entzündung bei den chronisch erkrankten Patienten vorlag, wurden sowohl aus den entzündlich veränderten Arealen als auch aus den nicht entzündeten Regionen Gewebebiopsien entnommen. Der aktuelle Entzündungsstatus wurde zunächst endoskopisch bestimmt und zudem anhand einer parallel entnommenen Biopsie histologisch durch einen erfahrenen Pathologen beurteilt.

Vor Beginn der Studie lag eine positive Bewertung der Ethik Kommission bei der Landesärztekammer Rheinland Pfalz vor. Alle Patienten und Probanden, die an dieser Studie teilnahmen, erhielten vor dem Eingriff eine ausführliche Aufklärung und willigten schriftlich in die Probenentnahme und Verwendung der Biopsien zu Forschungszwecken ein.

Die Biopsien wurden direkt nach der Entnahme bei -80 °C eingefroren und anschließend DNA und RNA isoliert. Bei ungefähr der Hälfte der Proben konnte aufgrund der geringen Gewebemenge nur DNA isoliert werden. Informationen über alle gesammelten Proben können Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 entnommen werden.

Tabelle 2.1 Auflistung aller gesammelten intestinalen Gewebeproben von gesunden Kontrollindividuen, MC-Patienten und CU-Patienten aus denen DNA isoliert wurde.

Krankheit	n (DNA)	Geschlecht (m/w)	Alter (Jahre)	
			Bereich	Mittelwert
<b>Kontrollen</b>	<b>78</b>			
Terminal Ileum	31	18/13	23-93	51
Colon	47	24/23	23-93	55
<b>MC</b>	<b>98</b>			
Terminal ileum				
Inaktiv	27	11/16	22-80	42
Aktiv	13	7/6	20-54	34
Colon				
Inaktiv	40	19/21	20-62	37
Aktiv	18	11/4	20-61	44
<b>CU</b>	<b>63</b>			
Inaktiv	37	18/19	21-73	42
Aktiv	26	13/13	24-80	45

Tabelle 2.2 Auflistung aller gesammelten intestinalen Gewebeproben von gesunden Kontrollindividuen, MC-Patienten und CU-Patienten aus denen RNA isoliert wurde.

Krankheit	n (RNA)	Geschlecht(m/w)	Alter (Jahre)	
			Bereich	Mittelwert
<b>Kontrollen</b>	<b>37</b>			
Terminal Ileum	13	5/8	23-67	47
Colon	24	13/11	23-69	50
<b>MC</b>	<b>52</b>			
Terminal Ileum				
Inaktiv	12	7/5	22-62	36
Aktiv	4	3/1	24-51	37
Colon				
Inaktiv	25	12/13	20-62	35
Aktiv	9	4/5	20-62	43
<b>CU</b>	<b>35</b>			
Inaktiv	23	9/14	26-68	41
Aktiv	12	6/6	26-59	37



## **2.2 Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen von intestinalen Gewebebiopsien**

### **2.2.1 DNA-Extraktion aus intestinalem Gewebe**

Die genomische DNA (gDNA) wurde mit Hilfe der Aussalzmethode (modifiziert nach (Miller et al. 1988)) isoliert. Die bei -80 °C eingefrorenen intestinalen Gewebeproben wurden mit 600 µl SE- Puffer (75 mM NaCl, 24mM NaEDTA; pH 8.0), 40 µl 10 % SDS Lösung und 10 µl Proteinase K (15 mg/ml) versetzt, gemischt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nachdem das Gewebe vollständig zersetzt war, wurden durch Zugabe von 270 µl 6 M NaCl-Lösung die Proteinbestandteile ausgefällt und durch anschließende Zentrifugation bei 8400 x g für 20 Minuten getrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene genomische DNA mit Hilfe von 1000 µl Ethanol (96 %) gefällt. Durch erneute Zentrifugation (14.000 x g, 20 min) wurde die DNA pelletiert und nachdem der Überstand abgenommen wurde, mit Ethanol (70 %) gewaschen und zentrifugiert (14.000 x g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 50-150 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 7,7) 1 h bei 37 °C gelöst. Die Konzentration der DNA wurde photometrisch mit Hilfe eines NanoDrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt und anschließend bei -20 °C eingefroren.

### **2.2.2 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA**

Die Bisulfitkonversion der in 2.2.1 aus intestinalem Gewebe isolierten gDNA erfolgte mit dem EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Es wurden 500 ng DNA jeder Probe eingesetzt und die bisulfitbehandelte DNA in 40 µl Elution Puffer eluiert.

Das Prinzip der Bisulfitbehandlung, zuerst beschrieben von Frommer und Mitarbeitern (Frommer et al. 1992) basiert auf der Erkenntnis, dass unmethylierte Cytosine im Gegensatz zu 5-Methylcytosinen während der Desaminierung mit Natriumbisulfit ( $\text{NaHSO}_3$ ) zu Uracil umgewandelt werden. Während des Prozesses geht die 5,6-Doppelbindung von Cytosin (C) eine Verbindung mit dem Bisulfit-Ion ein. Diese entstandene Zwischenverbindung wird durch Desaminierung in

sulfoniertes Uracil umgewandelt. Durch ein alkalisches Reaktionsmilieu wird die Sulfongruppe abgespalten und es entsteht Uracil. In der darauf folgenden PCR wird Uracil als Thymin (T) gelesen. Da 5'-Methylcytosin gegen die oben genannten Prozesse unempfindlich ist, können nach einer Bisulfitbehandlung unmethylierte (T) von methylierten Cytosinen (C) unterschieden werden.

### **2.2.3 Amplifizierung Bisulfit-behandelter DNA**

Um eine höhere Spezifität und Ausbeute für die zu untersuchenden Genabschnitte zu erhalten, wurden diese mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gen-spezifischen Primern amplifiziert. Forward und Reverse Primer sowie der für die Pyrosequenzierung benötigte Sequenzierprimer wurden mit der Pyromark Assay Design 2.0 Software (Qiagen, Hilden, Germany) designt. Je nach Assaydesign ist einer der beiden Primer am 5'-Ende biotinyliert, um für die spätere Pyrosequenzierung ein einzelsträngiges PCR-Produkt zu generieren. Insgesamt wurden neun Kandidatengene untersucht (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 Primersequenzen zur genspezifischen Methylierungsuntersuchung. Die Primer, an deren 5'-Ende sich eine Biotinmarkierung befindet, sind mit (bio) gekennzeichnet.

<b>Gen</b>	<b>Forward Primer (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer (5'-3')</b>	<b>Sequenzier Primer (5'-3')</b>	<b>Lokalisation</b>
<b>BACH2</b>	TGGGAGTTATTGATTA TTGGAAAGAGTAT	CACAAAACAAACATTTTC TCTTCCTATACCT (bio)	ATTAGTAGTTTT GGGTTTTAG	<b>Chr. 6:</b> 89926529-90296908
<b>IL17REL</b>	GTTTTGGATGTTTT TTTGGAAATTTAGA (bio)	CTCCAAACTAACCCCTAC AACT	ACAAAAAATAAA AACTACTCTTC	<b>Chr. 22:</b> 49994513-50012659
<b>MUC2</b>	TTTTGGGGTTAGGTTT GGAA (bio)	CCCTATAACCTAAATAC CAACACA	AAATCTAATCAA ACTCCTTA	<b>Chr. 11:</b> 1074875-1110511
<b>MUC6</b>	TTGGGAATGGGTGAT AATGG	ATCCAACCCCTTAATCA CCACT (bio)	GTTTAGATTTTG TTTGTTA	<b>Chr. 11:</b> 1012821-1036706
<b>MUC15</b>	ATTGGGTAGATTTTT GTATTTTATTTGA	TCCTACACTTCCTTTCA AAACTTAT (bio)	AGTATGAATTT AGGTATATTGAG	<b>Chr. 11:</b> 26559033-26572233
<b>STK4</b>	ATATGGTTATTTGATT TAGGAGAGGAGTAT	TCTCTTATCTAAAACCTT CCCCAAATTCC (bio)	TTTGTTTATTTAT GAGTAAGTGT	<b>Chr. 20:</b> 44966474-45079959
<b>STAT3</b>	TGTGTGAAGTGTTTA TTTGGTGTTTAAAG	ACTCTTTCCTATTAACCT TTAATTCTACC (bio)	GGAAGTTTTAAA TTAGGATGG	<b>Chr. 17:</b> 42313324-42388568
<b>STAT4</b>	GGTTTTTAAAGTTGT TTTATTTTGTAAGT	AACTATTCTTTACCCAA TAACCACAT (bio)	GTTATAATATTTT TAATTGAGGAGT	<b>Chr. 2:</b> 191029576-191151596
<b>WIPF1</b>	TGTTTTGGGAATATTT GAAAGAAGT	TTCCCCTACTATCTTCT AACCAATTT (bio)	AATTGATTTTATT ATATGTTTTTGA	<b>Chr. 2:</b> 174559572-174682916

Die Komponenten des Mastermix für die Amplifizierung Bisulfit-behandelter gDNA aus intestinalem Gewebe mittels Fast Start Taq DNA-Polymerase (Roche, Rotkreuz, Schweiz) sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4 Reaktionskomponenten zur Amplifizierung Bisulfit-behandelter gDNA.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
10 x Fast Start Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (20 mM)	5 µl	2 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs (10 mM/dNTP)	1 µl	200 µM/dNTP
Foward Primer (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Reverse Primer	2,5 µl	0,5 µM
Fast Start taq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl	2 U
RNase freies Wasser	36,6 µl	–
Bisulfit-behandelte DNA	2 µl	–
<b>Endvolumen</b>	<b>50 µl</b>	–

Für alle PCR-Primer wurden die optimale Annealingtemperatur und die Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen experimentell ermittelt. Für die verschiedenen Primer-Paare ergeben sich daher unterschiedliche PCR-Programme.

Tabelle 2.5 PCR-Programm für die Amplifizierung von *IL17REL*, *MUC6* und *MUC15*.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Initiale Denaturierung	95 °C	4 Minuten
2. Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3. Annealing	58 °C	30 Sekunden
4. Elongation	72 °C	2 Minuten
Zyklus ab Schritt 2		35 Zyklen
5. Finale Elongation	72 °C	7 Minuten

Tabelle 2.6 PCR-Programm für die Amplifizierung von *MUC2*.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Initiale Denaturierung	95 °C	4 Minuten
2. Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3. Annealing	57 °C	30 Sekunden
4. Elongation	72 °C	45 Sekunden
Zyklus ab Schritt 2		34 Zyklen
5. Finale Elongation	72 °C	7 Minuten

Tabelle 2.7 PCR-Programm für die Amplifizierung von *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	4 Minuten
2. Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3. Annealing	60 °C	30 Sekunden
4. Elongation	72 °C	45 Sekunden
Zyklus ab Schritt 2		35 Zyklen
5. Finale Elongation	72 °C	7 Minuten

Der Erfolg der PCR wurde mit einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Die PCR-Produkte wurden mit 6x Ladepuffer (Thermo Scientific, Waltham, USA) gemischt und auf ein mit Ethidiumbromid versetztes 1,5 % Agarosegel (w/v) geladen und durch Anlegen eines elektrischen Feldes bei 100 V, 25 min der Größe nach aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein 100 bp Längenstandard (Thermo Scientific, Waltham, USA) auf das Gel geladen, um nach der Visualisierung durch UV-Licht die Größe der entsprechenden Fragmente bestimmen zu können.

#### 2.2.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde 1998 von Ronaghi und Mitarbeitern (Ronaghi et al. 1998) entwickelt und stellt eine schnelle und akkurate Methode zur DNA-Sequenzierung dar. Die Abfolge einer DNA-Sequenz wird mit Hilfe von vier Enzymen (DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase) und zwei Substraten (Adenosin 5-phosphosulfat (APS) und Luciferin) bestimmt. Die zu bestimmende DNA liegt einzelsträngig vor und ein komplementärer Sequenzierprimer dient als Ausgangspunkt für die Sequenzierreaktion. Während dieser Reaktion werden nach und nach einzelne Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) hinzugegeben. Ist eines der dNTPs komplementär zur Ausgangssequenz, wird dieses durch die DNA-Polymerase eingebaut und ein Pyrophosphat (PPi) abgespaltet, welches durch ATP-Sulfurylase unter Anwesenheit von APS in ATP umgewandelt wird. Bei der anschließenden Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin durch ATP wird ein Lichtsignal generiert, das mittels einer CCD-Kamera detektiert wird. Die Höhe des Lichtsignals ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Die nicht

eingebauten dNTPs und das übrige ATP werden durch die hinzugegebene Apyrase abgebaut.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte anhand eines Standardprotokolls mit Hilfe der sogenannten Vacuum Prep Workstation (Qiagen, Hilden, Deutschland).

1. Zur Immobilisierung der jeweiligen PCR-Produkte wurden 40 µl Bindingpuffer (Qiagen) mit 22-40 µl PCR-Produkt und 3 µl Streptavidin-Sepharosebeads (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) in eine 96-well-PCR-Platte pipettiert, mit einer Klebefolie versiegelt (ThermoScientific, Surrey, Großbritannien) und bei 1400 min<sup>-1</sup> für 5 min gemischt. Durch die hohe Affinität von Streptavidin zu Biotin werden die PCR-Produkte, an deren einem Ende ein Primer mit Biotin gebunden ist, an die Sepharosebeads immobilisiert.

2. Für die spätere Sequenzierreaktion wurden 40 µl Annealingpuffer (Qiagen) und 2 µl Sequenzierprimer (10 µM) in einer Pyrosequenzierplatte (PSQ) gemischt.

3. Mit Hilfe einer am Vacuum Prep Tool (VPT) befindlichen Pumpe wurde ein Vakuum erzeugt und die vorbereiteten PCR-Produkte aus der 96-well-PCR-Platte angesaugt. Die immobilisierten PCR-Produkte werden durch die Sepharosebeads an den Filterspitzen des VPT fixiert. Das VPT wird mitsamt der PCR-Produkte für jeweils 5 sek nacheinander in 70 %igen Ethanol, Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH) und zuletzt in Waschpuffer (10 mM Tris-Acetat) getaucht. Diese Schritte dienen der Herstellung und Aufreinigung von einzelsträngigen PCR-Produkten.

4. Um die einzelsträngigen PCR-Produkte in die PSQ-Platte zu überführen wurde das VPT über die Platte gehalten und das Vakuum abgeschaltet.

5. Um Sekundärstrukturen der DNA zu vermeiden, wurde die PSQ-Platte für 2 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte auf Raumtemperatur abgekühlt, was die Bindung des Sequenzierprimers an die Ausgangssequenz ermöglicht.

6. Während des Abkühlens der PSQ-Platte wurde die Sequenzierkartusche (Qiagen) mit Substrat und Enzym-Mix sowie allen vier Nukleotiden befüllt. Die Menge der jeweiligen Komponenten wird durch die Pyro Q Software (Qiagen) für den jeweiligen Assay berechnet. Die PSQ-Platte und die Kartusche wurden in den Pyromark Q 96 ID (Qiagen) gestellt und der Lauf gestartet. Die Ergebnisse wurden mit der Pyro Q Software ausgewertet.

## 2.3 Genomweite Methylierungsuntersuchung mittels Infinium® HumanMethylation 450 BeadChip

Um einen Überblick über die genomweiten Unterschiede in der DNA-Methylierung in Gewebebiopsien von CU Patienten und Kontrollindividuen zu bekommen, wurde die DNA von insgesamt 24 Gewebeproben (8 Kontrollen, 8 nicht-entzündliche und 8 entzündliche CU-Proben) mit Hilfe des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip (Illumina, San Diego, USA) analysiert. Alle dazu notwendigen Arbeiten wurden am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg durchgeführt.

Der Infinium® HumanMethylation450 BeadChip ermöglicht es, die Methylierung von mehr als 450.000 CpGs über das gesamte Genom verteilte Positionen zu untersuchen. Dabei werden 99 % aller RefSeq Gene abgedeckt. Die untersuchten CpG befinden sich vor allem in den regulatorisch wichtigen Bereichen, wie z.B. Promoterregion, 5'UTR, 1. Exon, „Gene bodies“ und 3'UTRs. Unter anderem werden auch 96 % aller CpG-Inseln, sowie DNase hypersensitive Bereiche und miRNA Promoterregionen untersucht.

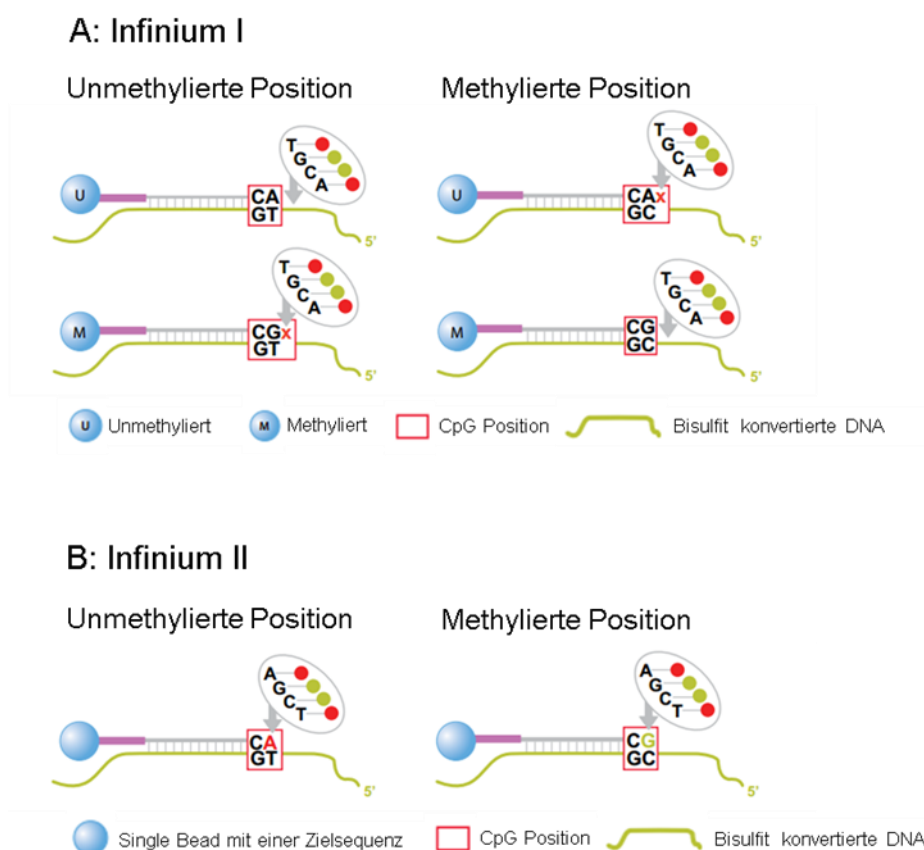


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Infinium I- und Infinium II-Technologie, auf dem der Infinium® HumanMethylation450 BeadChip aufgebaut ist.

(Quelle (10/2014): [http://www.illumina.com/content/dam/illumina-](http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_hm450_data_analysis_optimization.pdf)

[marketing/documents/products/technotes/technote\\_hm450\\_data\\_analysis\\_optimization.pdf](http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_hm450_data_analysis_optimization.pdf))

Die zu untersuchenden DNA-Proben (~500 ng) wurden zunächst Bisulfit-behandelt. Dabei wurden die unmethylierten Cytosine in Uracil umgewandelt um diese nach der anschließenden genomweiten Amplifikation als Thymin zu detektieren. In den folgenden Schritten wird die DNA denaturiert und auf den Infinium® HumanMethylation450 BeadChip hybridisiert. Der BeadChip kombiniert zwei Assay-Technologien von Illumina, Infinium I und Infinium II (Abbildung 2.1.). Die Infinium I-Technologie basiert auf dem Vorhandensein von zwei Sequenzen pro zu untersuchender Position. Eine Sequenz für die unmethylierte und eine für die methylierte Zielsequenz. Je nachdem ob die zu untersuchende CpG-Position in der Probe methyliert oder unmethyliert vorliegt, hybridisiert sie an eine der beiden Sequenzen auf dem BeadChip. Es folgt eine Einzelbasenverlängerungsreaktion mit Hapten markiertem Didesoxy-ribonukleosid-Triphosphat. Die Infinium II-Technologie basiert auf einer einzelnen Sequenz, an der sowohl die unmethylierte als auch die methylierte Zielsequenz binden kann. Der Methylierungsstatus wird in der nachfolgenden Einzelbasenverlängerungsreaktion bestimmt. Die Kombination der beiden Infinium Technologien erhöht die Sequenzierrate und sichert damit eine hohe Abdeckung der einzelnen Sequenzabschnitte. Die Auswertung der genomweiten Methylierungsanalyse wurde durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

## **2.4 Expressionsuntersuchung von sechs Kandidatengen in intestinalen Gewebebiopsien**

### **2.4.1 RNA-Extraktion aus intestinalem Gewebe**

Zur Isolation totaler RNA aus intestinalem Gewebe wurden 1-2 Biopsate mit einer EPPI-Mikropistille (VWR, Darmstadt, Deutschland) in 350 µl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Die anschließende Isolation totaler RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Im finalen Schritt wurde die totale RNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Die Qualität der RNA wurde



durch Auftrennung auf einem 1,5 % Agarose-Gel bestimmt. Dazu wurden ~400 ng RNA mit 2 µl RNase-freiem Wasser und 3 µl FDE Loading Dye (Thermo Fischer, Waltham, USA) gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Nachdem die Probe auf das Gel geladen wurde, erfolgte die Auftrennung bei 80 V für ca. 25 min. Intakte RNA sollte auf einem denaturierenden Agarosegel zwei deutliche rRNA Banden (28S und 18S) zeigen, wobei die 28S-Bande ca. doppelt so stark sein sollte wie die 18S-Bande. Liegt das Verhältnis (28S:18S) nicht bei 2:1 deutet das auf ein Vorliegen von degradierte RNA hin. Vollständig degradierte RNA würde als Schmier mit geringem molekularem Gewicht im Gel sichtbar werden.

#### **2.4.2 cDNA-Synthese**

Die Umschreibung der in der isolierten totalen RNA enthaltenen mRNA (siehe 2.4.1) in cDNA wurde mit Hilfe des SuperScript III First-Strand Synthesis System für RT-PCR (Invitrogen) durchgeführt. In die Synthesereaktion wurden 1 µg totale RNA eingesetzt und die weitere Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden sowohl 1 µl 50 µM Oligo(dT)20-Primer und 1 µl 50 ng/µl Random Hexamere für die Reaktion verwendet. Die generierte cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.4.3 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)**

Die qRT-PCR ermöglicht die Bestimmung der relativen mRNA Menge eines Zielgens in einer Patientenprobe im Vergleich zu einer Kontrollprobe. Die PCR Reaktion wurden auf dem StepOnePlus Real-Time PCR System (Life technologies, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt. Zur Detektion wurde der fluoreszierende Farbstoff SYBR Green (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen) verwendet, der sich nur in doppelsträngige DNA anlagert. Das durch das angelagerte SYBR Green generierte Fluoreszenz-Signal nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und ermöglicht so eine Quantifizierung der Zielsequenz. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anhand einer Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR überprüft. Die verwendeten Primer der sechs Zielgene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) und eines der zwei Referenzgene (*B2M*) wurden Exon-überspannend mit Hilfe der Primer 3

plus Software (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) entworfen (Tabelle 2.8). Für das zweite Referenzgen (*PPIA*) wurde ein Primerpaar aus einem QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Zur relativen Quantifizierung der mRNA-Menge wurde die cDNA auf eine Konzentration von 3 ng/μl verdünnt, sodass pro Reaktion 13,5 ng cDNA eingesetzt werden konnten. Jeder Reaktionsansatz (12 μl) enthielt 4,5 μl cDNA (3 ng/μl), 6,25 μl QuantiTect SYBR Green und 1,25 μl Forward und Reverse Primer-Mix (3 μM) bzw. QuantiTect Primer Assay. Die RTq-PCR wurde in zwei Stufen durchgeführt (1 Zyklus bei 95 °C für 20 Sekunden; 50x: 94 °C für 3 Sekunden, 60 °C für 30 Sekunden). Die Fluoreszenz wird während jedes PCR-Zyklus gemessen. Die Effizienz der PCR-Reaktion für jedes Primer-Paar wurde mit Hilfe der LinRegPCR-Software bestimmt und in die weitere Auswertung mit einbezogen. Die Ct-Werte (Threshold Cycle), die den ersten Zyklus angeben, bei dem das Fluoreszenz-Signal erstmalig signifikant über das durch die Hintergrundfluoreszenz hervorgerufene Signal ansteigt, wurden gegen die Ct-Werte der endogenen Kontrollgene (*B2M* und *PPIA*) normalisiert. Zur Auswertung wurde die  $\Delta\Delta$ -CT-Methode verwendet. Die entzündlichen und nicht-entzündlichen (MC terminale Ileum, MC Colon und CU Colon) Proben wurden mit den jeweiligen Kontrollen (Colon und terminale Ileum) verglichen. Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Tabelle 2.8 Primersequenzen für qRT-PCR.

Gen	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Lokalisation
<b><i>B2M</i></b>	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	Chr. 15: 44711477-44718877
<b><i>BACH2</i></b>	GCTGGTTGGACAGACAAAAA	AACAGCTTGGCAGTGTAGGC	Chr. 6: 89926529-90296908
<b><i>IL17REL</i></b>	TGAGGACCATCCCTCATTTTC	GCAGAGCCGCAGGTAGTAGT	Chr. 22: 49994513-50012659
<b><i>MUC2</i></b>	TGTGTCAGTGGCTGTGTGTG	GCAGTGTCCGTCAAAGTCGT	Chr. 11: 1074875-1110511
<b><i>MUC6</i></b>	CACGCTCACATCCTCCAAG	TCGATCTCAGTGTGGCTGTG	Chr. 11: 1012821-1036706
<b><i>STAT4</i></b>	ACTCCACAATGGGCTCGAC	TGTCATTTTGGTAGATTGCTCCT	Chr. 2: 191029576-191151596
<b><i>WIPF1</i></b>	CCTCTGCCTCCAAGTCCAG	TACTCCACTCCTGGATGGCA	Chr. 2: 174559572-174682916

## 2.5 *IL17REL*-Promoteranalyse

### 2.5.1 Generierung der *IL17REL*-Inserts

Die *IL17REL*-Promoteraktivität wurde mit Hilfe eines dualen Luciferase-Systems untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst ein Forward und drei Reverse Primer designt, die zur Amplifikation des putativen *IL17REL*-Promoterbereichs in verschiedenen Längen dienen (Abbildung 2.2). Am 5'-Ende des Forward Primers, der für die Herstellung aller Inserts (C1-C3) verwendet wurde, wurden vier beliebige Basen, hier CTAG, und die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *XhoI* (CTCGAG) angefügt (Tabelle 2.9). An den 5'-Enden der Reversen Primer wurde ebenfalls eine CTAG-Sequenz und die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *BglII* (AGATCT) hinzugefügt.

Tabelle 2.9 Primersequenzen für die Herstellung der pGL4-*IL17REL*-Inserts C1-C3. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind rot markiert.

Insert	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
pGL4.10- <i>IL17REL_C1</i>	CTAGCTCGAGGCAGTGCCCTCCCAGAAC	CTAGAGATCTCCACTGGTAAGCGTGGATGT
pGL4.10- <i>IL17REL_C2</i>	CTAGCTCGAGGCAGTGCCCTCCCAGAAC	CTAGAGATCTAGACTGTGGCCAGACACTTG
pGL4.10- <i>IL17REL_C3</i>	CTAGCTCGAGGCAGTGCCCTCCCAGAAC	CTAGAGATCTGCAGAGGGGTGGAATCTGTC

Die Amplifikation der verschiedenen Promoterbereiche aus gDNA erfolgte mit dem Forward Primer und dem jeweiligen Reverse Primer nach dem Standardprotokoll der Fast Start Polymerase (Tabelle 2.3). Die entstandenen PCR-Produkte (C1: 798 bp, C2: 587 bp und C3: 361 bp) wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des QIAquick PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.



Abbildung 2.2 Graphische Darstellung der untersuchten Bereiche des putativen *IL17REL* Promoters. Das längste Insert (C1) hatte eine Länge von 798 bp, beinhaltete die in der DNA-Methylierungsuntersuchung analysierten CpGs und liegt -806 - -8 vor dem Transkriptionsstart. In den C2- und C3-Inserts (587 bp; -806- -219 und 361 bp; -806 - -445) sind die mittels Pyrosequenzierung analysierten CpGs nicht mehr enthalten.

### 2.5.2 Restriktionsverdau mit *XhoI* und *BglII*

Um die verschiedenen Inserts (C1-C3) in den gewünschten pGL4.10-Vektor (Abb. 2.3) klonieren zu können, mussten zunächst alle Inserts sowie der leere pGL4.10 Vektor durch die Restriktionsenzyme *XhoI* und *BglII* (beide New England Biolabs) geschnitten werden. Alle benötigten Reagenzien (Tabelle 2.10) wurden in einem 200 µl-Reaktionsgefäß gemischt und bei 37° C für 1 h verdaut.

Tabelle 2.10 Zusammensetzung der Komponenten für einen Doppelverdau mit *XhoI* und *BglII*.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
NEBuffer 3.1	5 µl	1x
BSA (20 µg/µl)	5 µl	2 µg/µl
<i>XhoI</i> (20 U/µl)	1 µl	0,4 U/µl
<i>BglII</i> (20 U/µl)	1 µl	0,4 U/µl
DNA (Vektor oder Insert) (100 ng/µl)	20 µl	2 µg
Wasser	18 µl	-
<b>Endvolumen</b>	<b>50 µl</b>	

Um zu überprüfen, ob der Restriktionsverdau vollständig war, wurde mit jeweils 4 µl des Restriktionsprodukts eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Der pGL4.10 Vektor wird durch den Verdau linearisiert und ist im Gel als eine Bande mit einer Größe von ca. 4,2 kb zu erkennen. Ein unverdauter oder nicht vollständig verdauter Vektor würde sich nach einer Gelelektrophorese in drei Banden darstellen. Die geschnittenen Konstrukte sowie der pGL4.10 Vektor wurden mit dem Plasmid DNA purification Kit (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland)

nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration wurde photometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

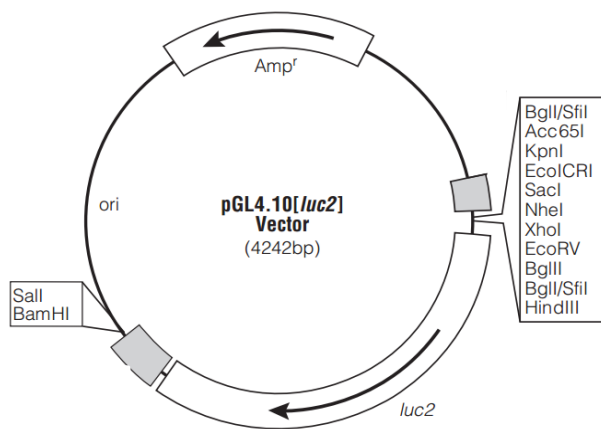


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des pGL4.10-Vektors (4242 bp), die die Restriktionsschnittstellen der einzelnen Enzyme und die Position der Gene für die Antibiotikaresistenz und des Luciferasereportergens zeigt.

### 2.5.3 Ligation

In der Ligationsreaktion werden die einzelnen Inserts mit dem pGL4.10 Vektor verbunden. Die Menge (ng) des Inserts, die in die Ligationsreaktion eingesetzt wurde, kann mit der folgenden Formel berechnet werden.

$$\text{(Menge Vektor (ng) * Größe des Inserts (kb)) / (Größe des Vektors (kb) * Molares Verhältnis von Insert und Vektor)}$$

In diesem Versuchsaufbau wurde ein molares Verhältnis von Insert zu Vektor von 3:1 verwendet. Die T4-Ligase, T4 Ligase Puffer (beides life technologies, Karlsruhe, Deutschland), die Insert-DNA und die Vektor-DNA (Tabelle 2.11) wurden in einem 200 µl Reaktionsgefäß gemischt und bei 16 °C über Nacht inkubiert. Die Ligationsprodukte wurden bis zur Transformation in kompetente *E.coli* Zellen bei -20°C gelagert.

Tabelle 2.11 Zusammensetzung der Ligationsreaktion, in der das jeweilige Insert (C1-C3) mit dem leeren pGL4.10 zusammengefügt wurde.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10x T4 Ligase Puffer	2 µl	1x
DNA pGL4.10 Vektor (100 ng/µl)	0,5 µl	50 ng
DNA Insert C1 (10 ng/µl)	3,1 µl	31 ng
DNA Insert C2 (10 ng/µl)	2,3 µl	23 ng
DNA Insert C3 (10 ng/µl)	1,5 µl	15 ng
T4 DNA Ligase (1 U/µl)	1 µl	0,05 U
Wasser	variabel	
<b>Endvolumen</b>	<b>20 µl</b>	

#### 2.5.4 Kultivierung von Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Bakterien (One Shot<sup>®</sup> TOP10, life technologies) wurden auf LB-Agar-Platten die mit Ampicillin versetzt wurden ausgestrichen und über Nacht (ü.N.) bei 37 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden dann in flüssige LB-Medium-Kulturen überführt und bei 250 rpm und 37 °C wieder ü.N. inkubiert.

LB-Medium (flüssig):

5 g/L Hefeextrakt

10 g/L Tryptone

5 g/L NaCl

pH=7,5

LB-Medium (Platten):

5 g/L Hefeextrakt

10 g/L Tryptone

5 g/L NaCl

15 g/L Agar

pH=7,5

Nachdem zu allen Zutaten 1000 ml bidest. Wasser hinzugefügt und der pH-Wert eingestellt wurde, wurde das Medium autoklaviert. Im Fall des Medium mit Agar wurde, nachdem das Medium auf ca. 40 °C abgekühlt war, 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt und auf 15-20 Platten verteilt. Zu dem Medium für Flüssig-Kulturen wurde das Ampicillin (100 µg/ml) kurz vor der Anwendung hinzugegeben.

### 2.5.6 Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen

Die Transformation der hergestellten Konstrukte (pGL4.10-*IL17REL*-C1, pGL4.10-*IL17REL*-C2 und pGL4.10-*IL17REL*-C3) in One Shot<sup>®</sup> TOP10 kompetente *E.coli* Zellen (life technologies, Karlsruhe, Deutschland) erfolgte nach Herstellerangaben. Je 1,5 µl Ligationprodukt (siehe 2.5.3) pro Vektor wurden zur Transformation genutzt und am Ende je 200 µl Zellsuspension auf zwei LB-Agar Platten verteilt. Die Platten wurden ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Von mindestens zehn Kolonien pro Platte wurde eine Kolonie-PCR mit Primern durchgeführt, die außerhalb der Multiple Cloning Site (MCS) lagen (Foward Primer: 5'-CTAACTGGCCGGTACCTGAG-3', Reverse Primer: 5'-TGTCACCTCGATATGTGCG-3'). Mit der Kolonie-PCR konnte eine erste Kontrolle durchgeführt werden, ob das Plasmid das gewünschte Insert aufgenommen hatte. Die Zusammensetzung des Mastermixes für die Kolonie-PCR ist Tabelle 2.12 zu entnehmen.

Tabelle 2.12 Komponenten der Amplifikationsreaktion zur Überprüfung der Transformation der pGL4.10-*IL17REL*-C1, C2 und C3-Konstrukte in kompetente *E.coli* Zellen mittels Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 x Fast Start Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (20 mM)	5 µl	2 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTPs (10 mM/dNTP)	1 µl	200 µM/dNTP
Foward primer (10 µM)	2,5 µl	0,5 µM
Reverse primer	2,5 µl	0,5 µM
Fast Start taq Polymerase (5U/µl)	0,4 µl	2 U
RNase freies Wasser	38,6 µl	–
<b>Endvolumen</b>	<b>50 µl</b>	–

Von jeder Kolonie wurde mit einer Pipettenspitze ca. die Hälfte von der Agarplatte abgetragen und in 50 µl des vorgelegten Mastermix (200 µl Reaktionsgefäß) überführt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2.13 PCR-Programm zur Durchführung der Kolonie-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	4 Minuten
2. Denaturierung	95 °C	30 Sekunden
3. Primer Anlagerung	60 °C	30 Sekunden
4. Elongation	72 °C	2 Minuten
Zyklus ab Schritt 2		35 Zyklen
5. Finale Elongation	72 °C	7 Minuten

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1,5 %iges Agarosegel geladen um die Größe der entstandenen Fragmente zu überprüfen. War die Ligation und anschließende Transformation erfolgreich, sollte die Bande für pGL4.10-*IL17REL-C1* eine Größe von ca. 798 bp, für pGL4.10-*IL17REL-C2* von 587 bp und pGL4.10-*IL17REL-C3* eine Größe von 361 bp haben. Eine Bande von ca. 240 bp würde entstehen, wenn nur die MCS amplifiziert wurde und somit kein Insert in dem Plasmid vorhanden war.

### 2.5.7 Sequenzierung der positiven Kolonien

War das Ergebnis der Kolonie-PCR positiv, d.h. ein Insert in gewünschter Größe wurde detektiert, wurde die zweite Hälfte der Kolonie in ein 15 ml Falconröhrchen mit 3 ml LB-Medium mit Ampicillin überführt und ü.N. bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Die Plasmid DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) isoliert. Zur DNA-Isolation wurden 1,5 ml *E.coli* Kultur verwendet und der Rest zur späteren Verwendung bei +4 °C gelagert. Im finalen Schritt wurde die Plasmid-DNA in 50 µl TE-Puffer eluiert und die Konzentration photometrisch mit Hilfe des NanoDrop ND1000 bestimmt.

Zur genauen Beurteilung wurde die MCS samt des Inserts mit Hilfe des CEQTM 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Brea, USA) sequenziert. Für die Sequenzierreaktion wurden die gleichen Primer (Forward oder Reverse) wie für die Kolonie-PCR verwendet. Die Plasmid-DNA wurde vor der Sequenzierreaktion 5 min bei 96 °C denaturiert. Die Komponenten für die Sequenzierreaktion sind aus Tabelle 2.14 zu entnehmen.



Tabelle 2.14 Zusammensetzung des Mastermix für die Sequenzreaktion.

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Foward primer (10 µM) oder	0,5 µl	0,25 µM
Reverse primer (10 µM)	0,5 µl	0,25 µM
CEQ-DTCS-Quickstart-Mix (Beckman Coulter)	2 µl	–
RNase-freies Wasser	5,5 µl	–
Plasmid DNA	2 µl	200 ng
<b>Endvolumen</b>	<b>10 µl</b>	–

Die PCR wurde mit folgenden Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2.15 PCR-Programm zur Durchführung der Sequenzreaktion.

<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1.	96 °C	20 Sekunden
2.	50 °C	20 Sekunden
3.	60 °C	4 Minuten
Zyklus ab Schritt 1		34 Zyklen

Nach der PCR wurde das Produkt der Sequenzreaktion mit Agencourt CleanSEQ magnetischen Beads (Beckman Coulter) unter Verwendung des Biomek 3000 Roboters (Beckman Coulter) aufgereinigt. Während dieser automatisierten Aufreinigung wurden die Produkte der Sequenzreaktion an die magnetischen Beads gebunden und mit 85 %igen Ethanol gewaschen, um unerwünschte Reste der PCR, wie z.B. Nukleotide, nicht eingebaute Farbstoffe und Salze zu entfernen. Die aufgereinigten Produkte wurden anschließend mit Hilfe der Sample Loading Solution (SLS) wieder von den Beads getrennt und zur Sequenzierung mit Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierung wurde mit dem CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter) durchgeführt und die generierten Sequenzdaten mit Hilfe der Mutation Surveyor 3.23 Software (Softgenetics) ausgewertet.

Die Auswertung der Sequenzen zeigte nun welche untersuchten Klone das gewünschte Insert in der richtigen Orientierung aufgenommen haben. Von diesen Klonen wurde eine 200 ml-Kultur angelegt und ü.N. bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die DNA wurde mit Hilfe des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Im finalen Schritt wurde das DNA-Pellet in 450 µl TE

Puffer gelöst und die Konzentration photometrisch mit Hilfe eines NanoDrop ND1000 (Peqlab, Erlangen, Deutschland) quantifiziert. Die DNA der fertigen Konstrukte wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.5.8 Kultivierung humaner Colonkarzinom-Zellen**

Allgemein versteht man unter Zellkultur die Kultivierung und Vermehrung eukaryotischer Zellen *in vitro*. Die in dieser Arbeit verwendeten HCT116-Zellen wachsen als Einzelschicht (Monolayer) in speziellen Kulturflaschen aus Plastik. Unter Subkultivierung oder Zellpassage versteht man das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit Trypsin/EDTA und der erneuten Kultivierung.

Die Vermehrung der humanen Colokarzinom-Zelllinie HCT116 erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> liegend in Zellkulturflaschen (Greiner Bio One). Die Zellen wurden mit Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) kultiviert, welches sich aus 500 ml DMEM „Low Glucose“ (PAA), 60 ml FKS Fetalem Kälberserum und 5 ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) zusammensetzt. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert und die Zellen je nach Bedarf passagiert.

### **2.5.9 Passagieren der HCT116 Zellen**

Für die Subkultivierung der HCT116 Zellen wurde das vorhandene Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Gibco) gewaschen, mit 3 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) 0,05% (Gibco) versetzt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin löst die Proteinbindungen zwischen den einzelnen Zellen und der Kulturflasche und es entsteht eine Zellsuspension. Durch Zugabe von 10 ml DMEM wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen resuspendiert, um die Zellen in der Suspension zu vereinzeln. Anschließend konnten die Zellen gezählt werden und in eine neue Kulturflasche überführt werden.

### **2.5.10 Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblaulösung (4 %) gemischt und davon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer

pipettiert. Trypanblau wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen und kann so zur Selektion von abgestorbenen Zellen benutzt werden, da sich tote Zellen im Gegensatz zu den vitalen Zellen blau färben. Unter einem Lichtmikroskop wurde die Zellzahl für je vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet.

Mittelwert der Zellen aus 4 Großquadraten  $\times 10^4 \times 2$  (Verdünnungsfaktor)  
=Zellzahl/ml

### 2.5.11 Transiente Transfektion mit Lipofectamin3000

Im Gegensatz zur stabilen oder retroviralen Transfektion eukaryotischer Zellen, bei der eine Integration der DNA in das Zellgenom stattfindet, kommt es bei der transienten Transfektion nur zu einer vorübergehenden Integration in die Zelle. Bei weiteren Zellteilungen gehen die eingeschleusten Gene und damit deren Funktionen wieder verloren. Alle transienten Transfektionen im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Lipofectamin®3000 Reagent (Life technology, Karlsruhe, Deutschland) durchgeführt, welches eine geringe Zelltoxizität aufweist und die Verwendung von vergleichsweise geringen DNA-Mengen ermöglicht.

Für die Transfektion von HCT116-Zellen wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro Well einen Tag vor Versuchsbeginn in einer 48-Well-Kulturplatte ausgesät. Nach ca. 20 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> waren die Zellen zu ca. 70-80 % konfluent. Die DNA der unter 2.5.3 und 2.5.7. hergestellten Konstrukte (pGL4.10-*IL17REL*-C1, pGL4.10-*IL17REL*-C2 und pGL4.10-*IL17REL*-C3), sowie der Renilla Kontrollvektor (pRL-TK) und der pGL4.10-Leervektor wurden auf 100 ng/μl mit Wasser verdünnt. Alle Transfektionsversuche wurden in Triplikaten durchgeführt. Zunächst wurden pro Well jeweils 400 ng des zu untersuchenden Vektors, 40 ng pRL-TK und 0,8 μl (2 μl pro μg DNA) P3000 Reagent (life technologies) mit 17,5 μl OptiMEM® (Gibco) gemischt. Zu jedem Well wurden noch 1 μl Lipofectamin®3000 Reagent, das mit 17,5 OptiMEM® verdünnt wurde, hinzugegeben. Der DNA/Lipofectamin-Mix wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen, die am Vortag in einer 48-well-Platte ausgesät wurden, mit 200 μl DPBS gewaschen und 200 μl neues DMEM-Medium zugegeben. In jedes Well wurden anschließend 35 μl des DNA/Lipofectamin-Mix gegeben und durch schwenken der Platte gemischt. Die Zellen wurden weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 5 h wurde das

Transfektionsmedium abgesaugt und durch frisches DMEM ersetzt, um die Toxizität des Lipofectamin zu verringern und die Viabilität der Zellen zu steigern. Nach weiteren 19 h wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 200 µl DPBS gewaschen.

### **2.5.12 Messung der Luciferase Aktivität**

Die Luciferase-Aktivität wurde mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die unter 2.5.11 transfizierten Zellen wurden nach dem Waschen mit 200 µl DPBS durch Zugabe von 65 µl Lysepuffer (im Kit enthalten) lysiert. Die Firefly- und Renillaluciferase Aktivität wurde mit dem Spectra-FluorPlus Fluorometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Firefly Luciferase-Aktivität von jedem Vektor (pGL4.10-*IL17REL*-C1, pGL4.10-*IL17REL*-C2 und pGL4.10-*IL17REL*-C3) wurde gegen die entsprechende Renilla Luciferase-Aktivität normalisiert, um die relative Luciferase-Aktivität zu erhalten. Die statistische Auswertung wurde mit der SPSS-Software (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen

Zu Beginn der Studie wurden anhand der unter 1.5 beschriebenen Literatur mehrere Gene aus den CED-Suszeptibilitätsloci ausgewählt, die entweder an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Darm beteiligt sind und Expressionsveränderungen in CED-Patienten aufweisen oder mit CED assoziierte Mutationen zeigten. Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde die Methylierung der Promoterregionen der Gene in allen gesammelten Gewebeproben (Kontrollen terminales Ileum (K TI) und Colon (K Colon), Morbus Crohn terminales Ileum nicht-entzündlich (MC TI NE) und entzündlich (MC TI E), Morbus Crohn Colon nicht-entzündlich (MC Colon NE) und entzündlich (MC Colon E) und Colitis Ulcerosa Colon nicht-entzündlich (CU Colon NE) und entzündlich (CU Colon E) bestimmt. In der statistischen Auswertung wurden alle Proben in Gruppen nach Erkrankung und betroffenen Arealen eingeteilt und innerhalb dieser Gruppe miteinander verglichen (Tabellen 3.1, 3.2 und 3.3). Vier der untersuchten Gene (*IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*) zeigten signifikante Methylierungsunterschiede der Promoterregion in mindestens einer dieser Gruppen.

Tabelle 3.1 Gruppenvergleiche für terminales Ileum-Gewebe von Morbus Crohn-Patienten und Kontrollpersonen.

	<b>K TI</b>	<b>MC TI NE</b>	<b>MC TI E</b>
<b>K TI</b>		x	X
<b>MC TI NE</b>	x		X
<b>MC TI E</b>	x	x	

Tabelle 3.2 Gruppenvergleiche für Colon-Gewebe von Morbus Crohn-Patienten und Kontrollpersonen.

	<b>K Colon</b>	<b>MC Colon NE</b>	<b>MC Colon E</b>
<b>K Colon</b>		x	x
<b>MC Colon NE</b>	x		x
<b>MC Colon E</b>	x	x	

Tabelle 3.3 Gruppenvergleiche für Colon-Gewebe von Colitis Ulcerosa-Patienten und Kontrollpersonen.

	K Colon	CU Colon NE	CU Colon E
K Colon		x	x
CU Colon NE	x		x
CU Colon E	x	x	

### 3.1.1 Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen des terminalen Ileum in MC-Patienten

In der genspezifischen Methylierungsanalyse der Promoterregionen von *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* mittels Pyrosequenzierung konnten im Vergleich der K TI mit MC TI NE und MC TI E (Tabelle 3.1) signifikante Methylierungsunterschiede für *MUC15* detektiert werden. Die in Abbildung 3.1 dargestellten Boxplots zeigen die Methylierung in Prozent für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* im NE (n=27) und E (n=13) terminalen Ileum-Gewebe von MC-Patienten und den entsprechenden Kontrollen (K TI; n=31).

Das entzündliche TI (Median=83,0 %), weist eine signifikant erniedrigte *MUC15*-Promotermethylierung (p=0,03) im Vergleich mit dem NE TI (Median=84,0 %) auf. Im Vergleich der K TI-Proben (Median=41,0 % bzw. 46,5 %) mit den MC TI E-Proben (Median=51,0 % bzw. 53,0 %) ist für *IL17REL* und *MUC2* ein leichter, allerdings nicht signifikanter Anstieg der Promotermethylierung zu erkennen (Tabellen 3.4 und 3.5). Die *MUC6*-Promotermethylierung zeigte keine Unterschiede in den untersuchten Gruppen.

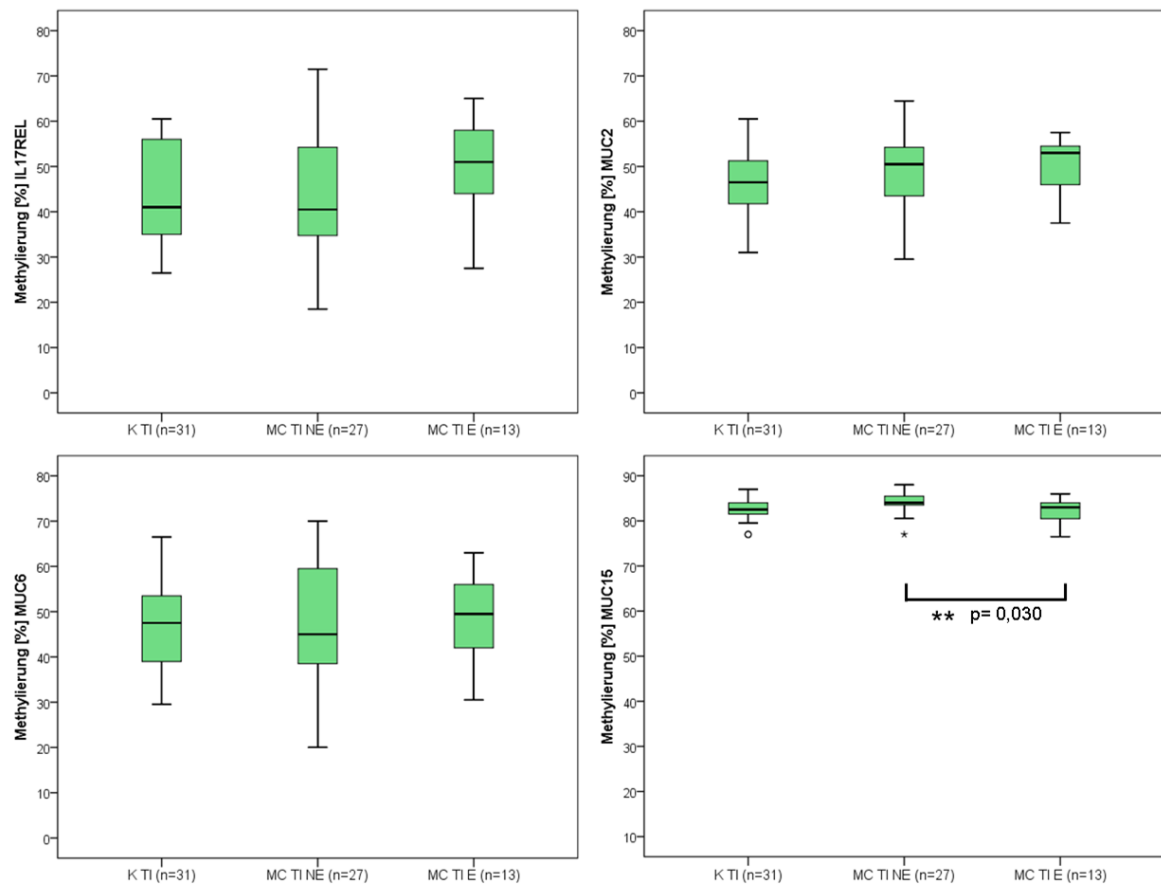


Abbildung 3.1 Promotermethylierung in [%] von *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* gemessen im TI-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden TI-Proben von Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.

Tabelle 3.4 p-Werte der Vergleiche der MC TI NE- und MC TI E-Proben mit den K TI-Proben für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>MUC15</i>
K TI MC TI NE	0,95	0,13	0,71	0,10
K TI MC TI E	0,091	0,074	0,19	0,40
MC TI NE MC TI E	0,087	0,54	0,31	<b>0,03</b>

Tabelle 3.5 Promotermethylierung (Median) der MC TI NE-, MC TI E- und K TI- Proben für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*.

Median [%]	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>MUC15</i>
<b>K TI</b>	41,0	46,5	47,5	82,5
<b>MC TI NE</b>	40,5	50,5	45,0	84,0
<b>MC TI E</b>	51,0	53,0	49,5	83,0

### 3.1.2 Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen von Colon-Gewebe in MC-Patienten

Die Methylierungsanalyse der Promoterregionen von *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* im Colon-Gewebe von MC-Patienten im Vergleich zum Colon-Gewebe von Kontrollpersonen ergab aberrante Methylierungsmuster für *IL17REL* und *MUC6*. In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalyse der drei zu vergleichenden Gruppen (K Colon; n=47, MC Colon NE; n=40 und MC Colon E; n=18) für alle untersuchten Gene in Prozent dargestellt. *IL17REL* zeigt eine signifikant erhöhte Promotermethylierung in MC-Patienten sowohl in den E- ( $p=2,0 \cdot 10^{-12}$ , Median=51,0 %) als auch in den NE- ( $p=0,002$ , Median=35,0 %) Proben im Vergleich mit den Kontrollen (Median=31,5 %). Darüber hinaus ist die *IL17REL*-Methylierung in den MC Colon E-Proben signifikant höher als in den MC Colon NE-Proben ( $p=0,0007$ ).

Der Drei-Gruppen-Vergleich (Tabelle 3.2) ergab für *MUC6* ebenfalls eine signifikant erhöhte Promotermethylierung in MC-Patienten sowohl in den E Colon- ( $p=2,0 \cdot 10^{-9}$ , Median=52,7 %) als auch in den NE Colon-Proben ( $p=4,0 \cdot 10^{-9}$ , Median=43,0 %). Der Vergleich der MC Colon NE- mit den MC Colon E-Proben zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Methylierung ( $p=8,5 \cdot 10^{-5}$ ).

Für die Promotermethylierung von *MUC2* und *MUC15* wurden keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen. Im Vergleich der MC Colon E-Proben (Median=50,75 %) mit den Colon-Kontrollproben (Median=46,5 %) war allerdings ein geringer Anstieg im Grad der Methylierung für *MUC2* zu beobachten.

Die p-Werte aller Gruppenvergleiche und Gene sind Tabelle 3.6 zu entnehmen.



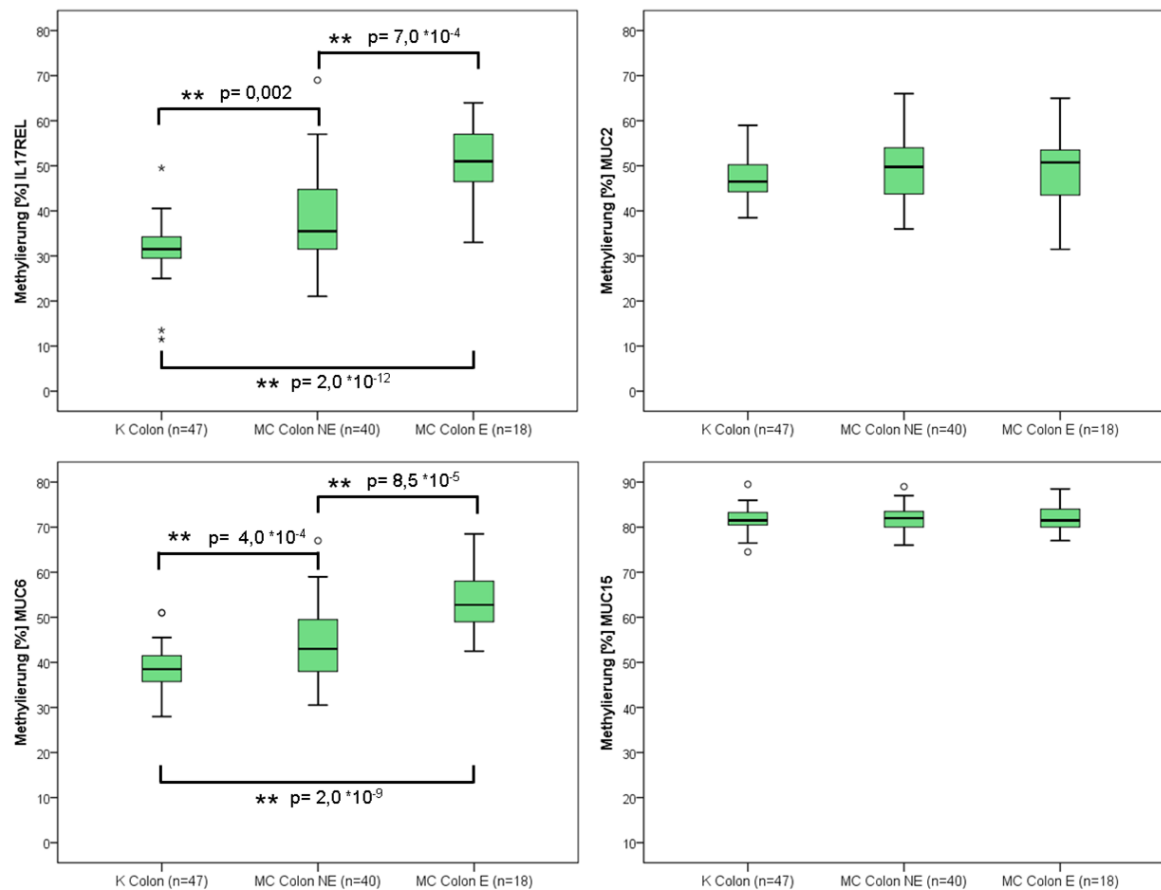


Abbildung 3.2 Promotermethylierung in [%] von *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* gemessen im Colon-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden Colon-Proben von Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.

Tabelle 3.6 p-Werte der Vergleiche der MC Colon NE- und MC Colon E-Proben mit den Colon-Kontrollproben für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>MUC15</i>
K Colon MC Colon NE	<b>0,002</b>	0,10	<b><math>4,0 \cdot 10^{-4}</math></b>	0,48
K Colon MC Colon E	<b><math>2,0 \cdot 10^{-12}</math></b>	0,38	<b><math>2,0 \cdot 10^{-9}</math></b>	0,90
MC Colon NE MC Colon E	<b><math>7,0 \cdot 10^{-4}</math></b>	0,67	<b><math>8,1 \cdot 10^{-5}</math></b>	0,60

Tabelle 3.7 Promotermethylierung (Median) der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*.

Median [%]	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>MUC15</i>
<b>K Colon</b>	31,5	46,5	38,5	81,5
<b>MC Colon NE</b>	33,5	49,8	43,0	82,0
<b>MC Colon E</b>	51,0	50,8	52,8	81,5

### 3.1.3 Genspezifische DNA-Methylierungsanalysen von Colon-Gewebe in CU-Patienten

Der Vergleich der CU Colon-Proben (NE n=37 und E n=26) mit den Colon-Kontrollproben (n=47) (Tabelle 3.3) ergab signifikante Veränderungen der Promotermethylierung in allen vier untersuchten Genen (Abbildung 3.3). *IL17REL* und *MUC6* zeigten eine signifikant höhere Promotermethylierung in CU-Patienten sowohl in den E- ( $p=1,8 \cdot 10^{-15}$ ,  $p=3,9 \cdot 10^{-12}$ , Median=52,5 % bzw. 55,0 %) als auch in den NE- ( $p=0,0047$ ;  $p=0,005$ ; Median=36,0 % bzw. 43,0 %) Proben gegenüber den Kontrollproben (Median=31,5 % bzw. 38,5 %). Darüber hinaus sind die gemessenen Werte der *IL17REL*- und *MUC6*-Methylierung in den CU Colon E-Proben signifikant höher als in CU Colon NE-Proben ( $p=2,0 \cdot 10^{-8}$ ,  $p=2,4 \cdot 10^{-6}$ ). Eine signifikant höhere Promotermethylierung in den CU Colon E-Proben (Median=50,75 %) im Vergleich mit den K Colon-Proben (Median=46,5) konnte ebenfalls für *MUC2* detektiert werden ( $p=0,019$ ). Eine signifikante Verringerung der Methylierung war zudem für den *MUC15*-Promoter im Vergleich der CU Colon NE-Proben (Median=80,5 %) mit den K Colon-Proben ( $p=0,002$ , Median=81,5 %) zu beobachten. Alle weiteren p-Werte und Methylierungswerte (Median) der beschriebenen Vergleiche sind den Tabelle 3.8 und 3.9 zu entnehmen.

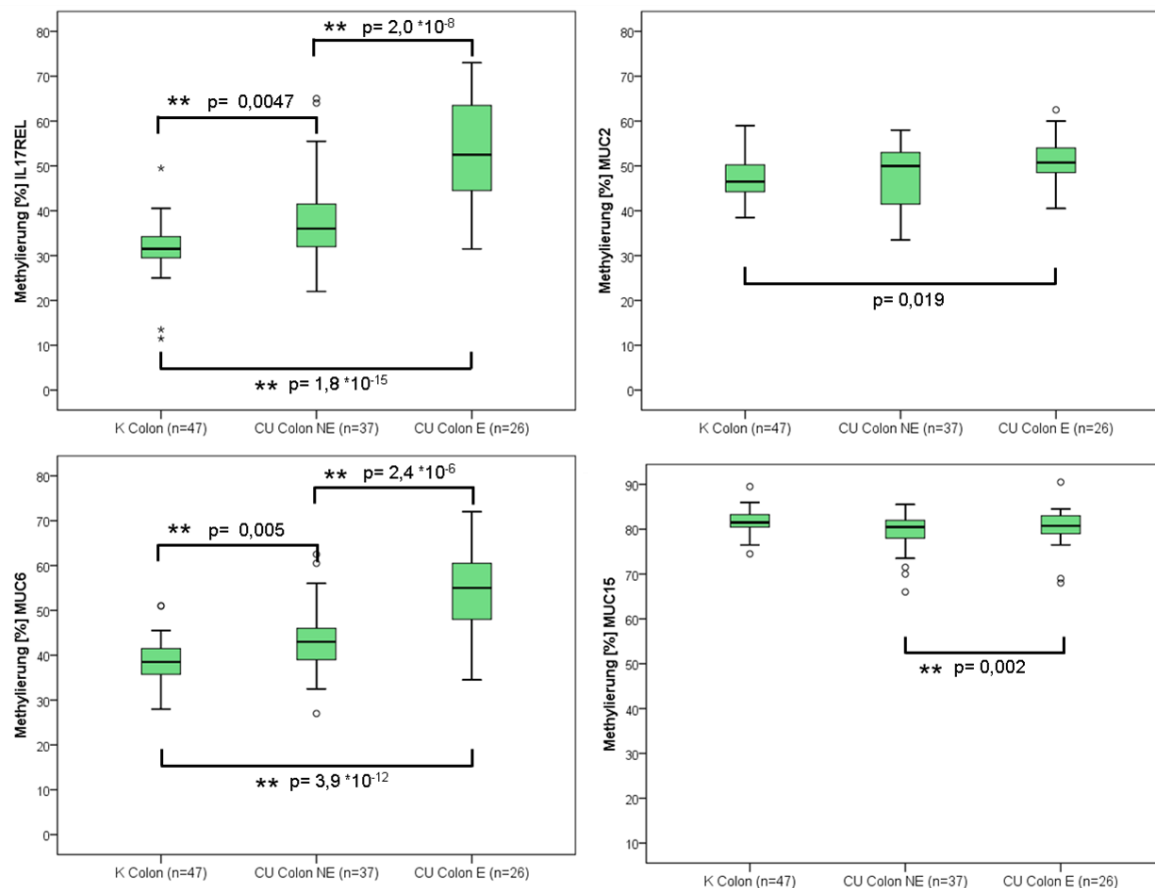


Abbildung 3.3 Promotermethylierung in [%] von *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15* gemessen im Colon-Gewebe von CU-Patienten und entsprechenden Colon-Proben von Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.

Tabelle 3.8 p-Werte der Vergleiche der CU Colon NE- und CU Colon E-Proben mit den Colon Kontrollproben für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>MUC15</i>
K Colon CU NE	<b>0,0047</b>	0,49	<b>0,005</b>	<b>0,002</b>
K Colon CU E	<b><math>1,8 \cdot 10^{-15}</math></b>	<b>0,019</b>	<b><math>3,9 \cdot 10^{-15}</math></b>	0,064
CU NE CU E	<b><math>2,0 \cdot 10^{-8}</math></b>	0,08	<b><math>2,4 \cdot 10^{-6}</math></b>	0,32

Tabelle 3.9 Promotermethylierung (Median) der CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben für *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *MUC15*.

Median [%]	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>MUC15</i>
<b>K Colon</b>	31,5	46,5	38,5	81,5
<b>CU Colon NE</b>	36,0	50,0	43,0	80,5
<b>CU Colon E</b>	52,5	50,8	55,0	80,8

### 3.2 Genomweite Methylierungsuntersuchung von CU Colon-Gewebeproben mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip

Die größten Methylierungsunterschiede in den genspezifischen Analysen wurden im Colon-Gewebe von CU-Patienten gefunden. Da nur eine limitierte Anzahl von Proben genomweit untersucht werden konnte, wurden jeweils acht Colon-Kontrollproben, acht CU Colon NE-Proben und acht CU Colon E-Proben mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip analysiert. Insgesamt wurde die Methylierung von über 480.000 über das ganze Genom verteilten CpGs gemessen. In der Auswertung wurden wie auch in den genspezifischen Analysen jeweils die Colon-Kontrollproben mit den CU Colon NE- und den CU Colon E-Proben, sowie die CU Colon NE- mit den CU Colon E-Proben verglichen.

Der Vergleich der CU Colon NE-Proben mit den Kontrollproben zeigte nach der Adjustierung des p-Wertes für genomweite Analysen keine signifikant auffälligen Unterschiede des Methylierungsgrades der untersuchten CpGs. Im Vergleich der CU Colon E-Gewebeproben mit den Colon-Kontrollproben zeigten 3816 CpGs eine signifikant höhere oder niedrigere Methylierung (p-Wert adj. <0,001; LogFC >1). Diese 3816 CpGs waren auf 2567 verschiedene Gene verteilt. Die hundert differentiell methylierten CpGs mit der höchsten Signifikanz werden in der Heatmap in Abbildung 3.4 gezeigt. Eine Tabelle mit allen signifikant auffälligen CpGs, den entsprechenden p-Werten, den adjustierten p-Werten, der Gen-Nomenklatur und den LogFC-Werten ist der CD im Anhang zu entnehmen.

Im Vergleich der CU Colon NE- mit den CU Colon E-Gewebeproben wurden 219 CpGs mit signifikant erhöhter oder verminderter Methylierung identifiziert. Diese 219 CpGs waren auf 198 verschiedene Gene verteilt. Eine Heatmap der 100 CpGs mit der größten Signifikanz ist in Abbildung 3.5 dargestellt.

Alle drei Vergleiche (K-E, K-NE und NE-E) und die Anzahl der daraus resultierenden auffälligen CpGs sind in einem Venn-Diagramm in Abbildung 3.6 dargestellt.

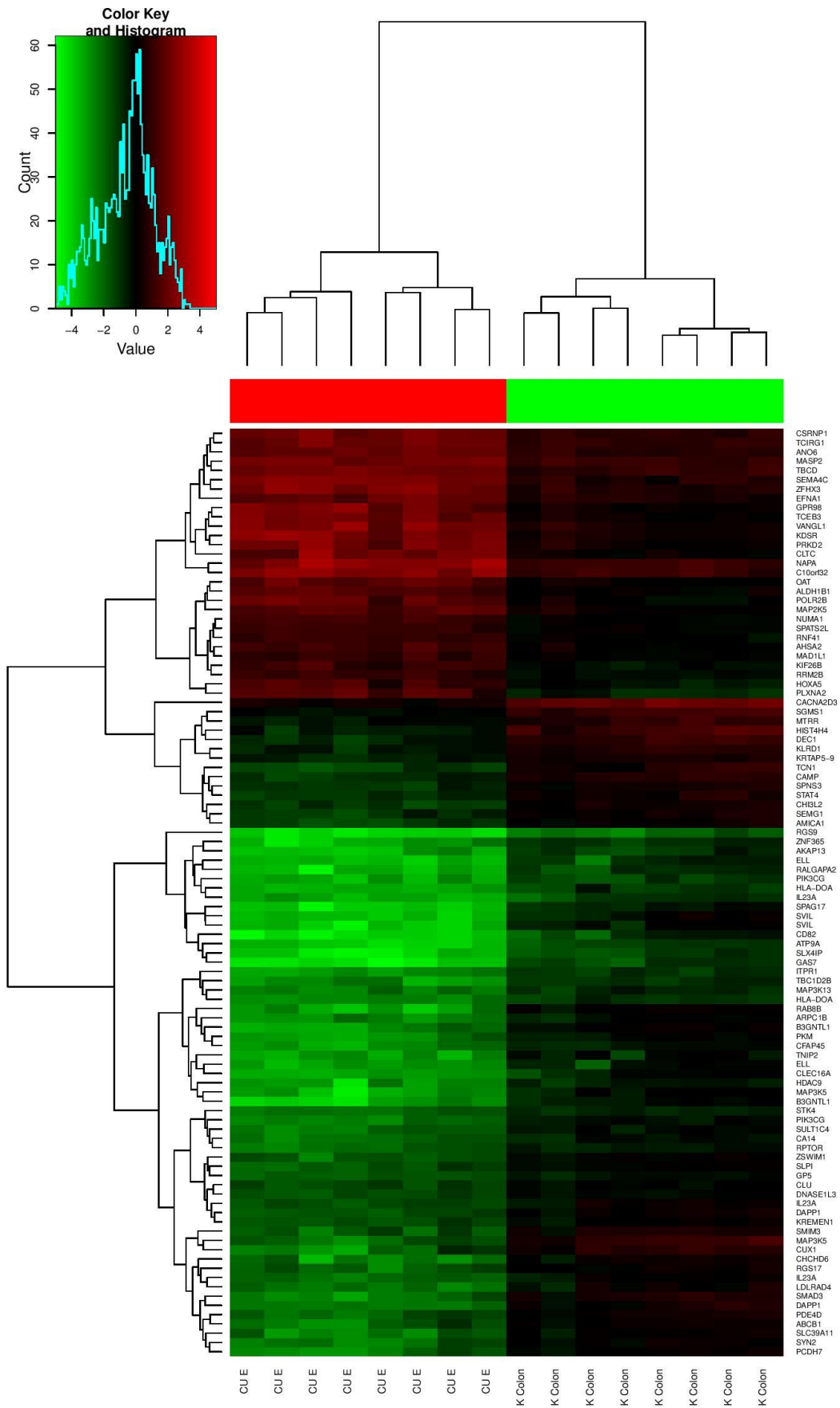


Abbildung 3.4 Heat Map der 100 differentiell methylierten CpG-Sites mit der höchsten Signifikanz aus dem Vergleich der CU Colon E-Proben mit den Colon Kontrollproben.

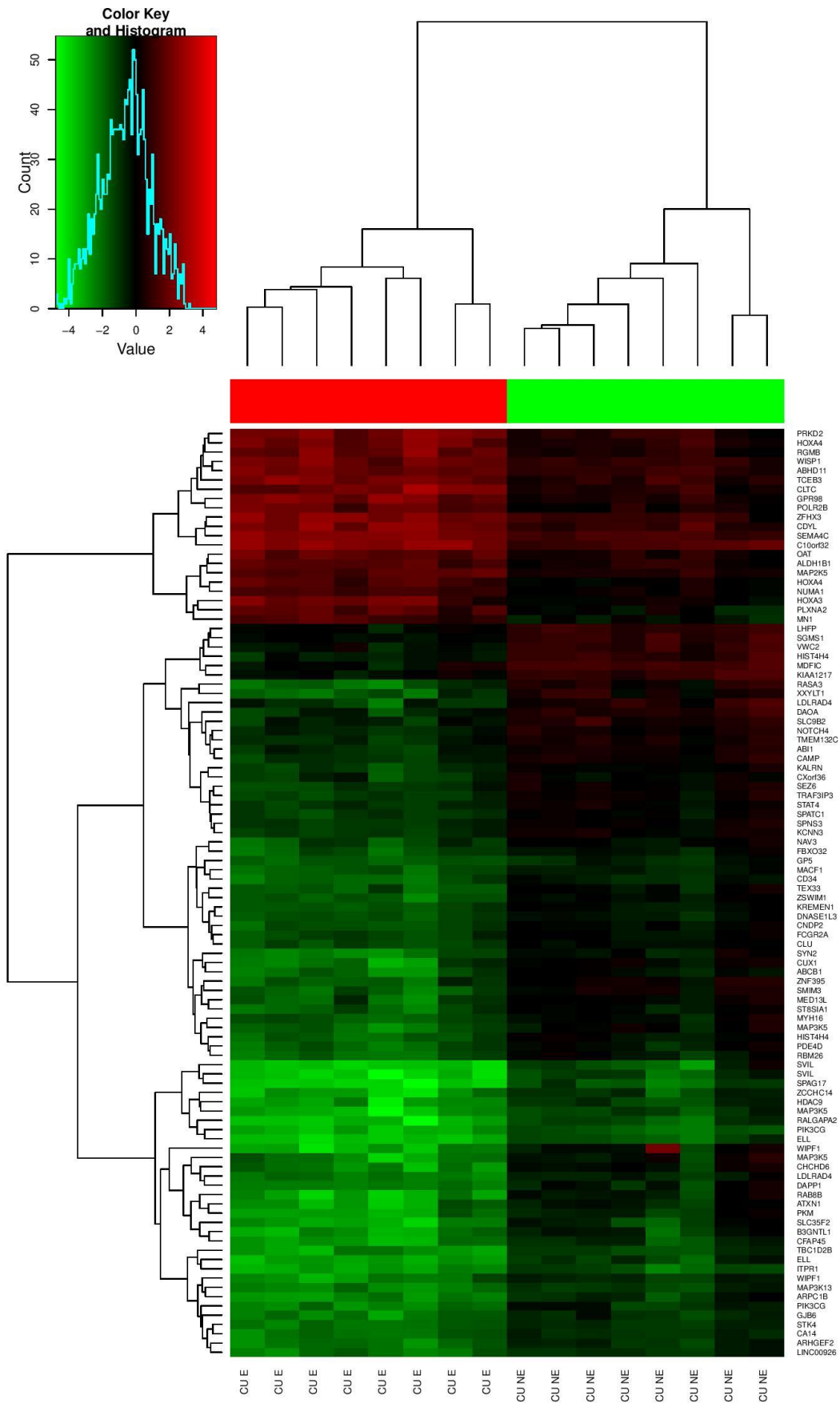


Abbildung 3.5 Heat Map der 100 differentiell methylierten CpG-Sites mit der höchsten Signifikanz aus dem Vergleich der CU Colon NE- mit den CU Colon E-Proben.

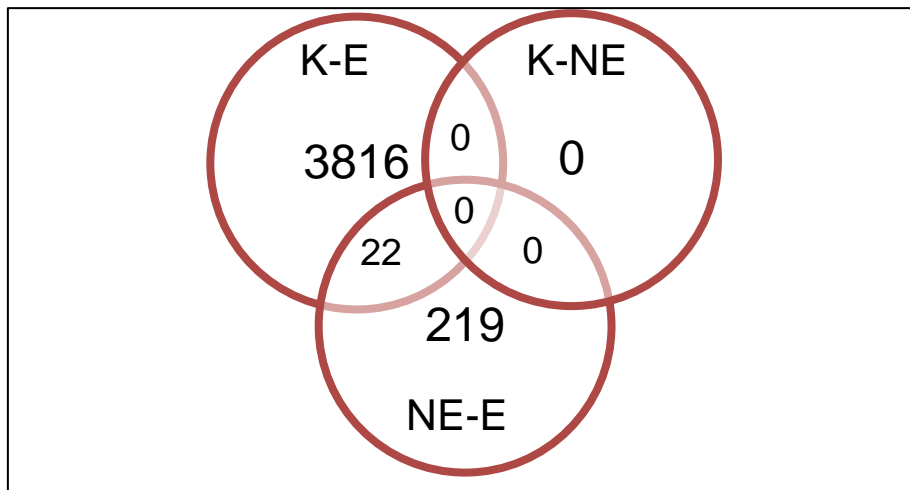


Abbildung 3.6 Venn-Diagramm der signifikant ( $p < 0,001$ ;  $\text{LogFC} > 1$ ) auffälligen CpG-Sites in den drei vergleichenden Analysen.

Eine genauere Analyse der signifikant auffälligen Gene zeigte, dass einige dieser Gene, z.B. *BACH2*, *CDH1*, *MUC2*, *PTPN22* und *STAT4*, bereits mit CED assoziiert wurden, andere wiederum noch nicht im Zusammenhang mit CED oder entzündlichen Prozessen beschrieben sind. Um die große Anzahl von Genen besser charakterisieren zu können und diese zunächst in funktionelle Gruppen zu unterteilen, wurden Pathway-Analysen mit Hilfe der Ingenuity-Software (Qiagen) durchgeführt.

Im ersten Schritt wurden die Gene bekannten biologischen Abläufen zugeordnet, in denen diese aktiv sind. Eine Aufstellung der relevanten Signalwege, zu denen mindestens 20 Gene mit in der genomweiten Methylierungsanalyse nachgewiesener signifikanter differentieller Methylierung beitragen, ist Abbildung 3.7 zu entnehmen.



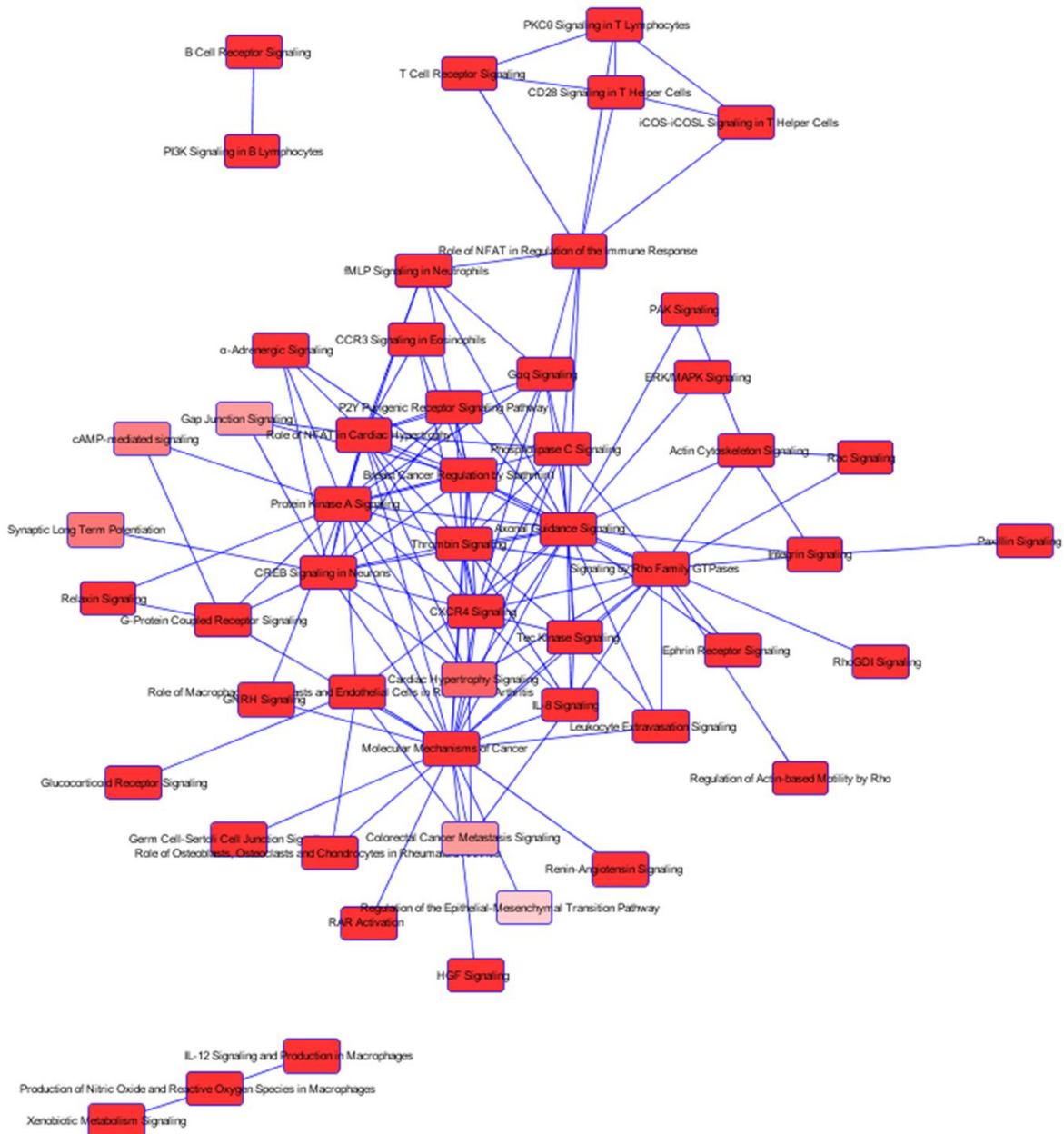


Abbildung 3.7 Netzwerk der relevanten Signalwege, zu welchen mindestens 20 Gene mit in der genomweiten Methylierungsanalyse nachgewiesener signifikanter differentieller Methylierung gehören.

Das abgebildete Netzwerk aus den signifikant auffälligen Signalwegen zeigt in den roten Kästen jeweils einen Signalweg und den dazugehörigen Namen. Je heller das Rot ist, desto höher ist die Signifikanz. Die blauen Verbindungslinien zeigen an, dass diese zwei Signalwege auf 20 oder mehr in dieser Studie auffälligen gleichen Genen beruhen.

Das Balkendiagramm in Abbildung 3.8 zeigt die 16 mit höchster Signifikanz assoziierten Signalwege, bei denen die höchste Anzahl an CED-assoziierten Genen, die in dieser Studie identifiziert wurden, eine Rolle spielen.

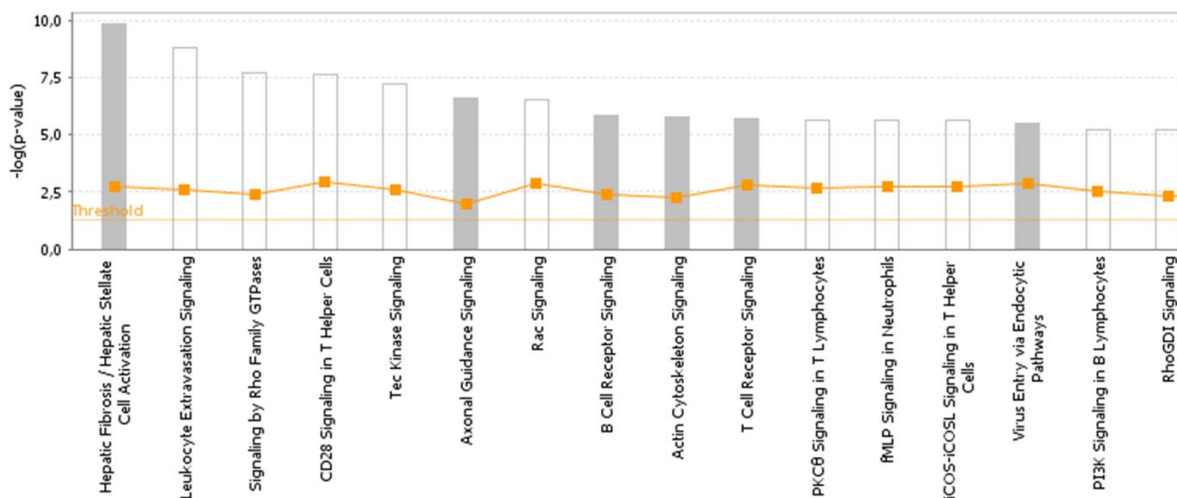


Abbildung 3.8 Balkendiagramm der 16 Signalwege, in denen eine große Anzahl an Gene eine Rolle spielen, die eine aberrante Methylierung in Colon-Proben der CU-Patienten im Vergleich mit den Colon-Proben der Kontrollpersonen aufwiesen.

Neben den Signalwegen, wurden die in den Methylierungsanalysen auffälligen Gene auch auf bekannte Krankheitsassoziation hin untersucht. Eine Liste der Krankheiten, mit denen die meisten identifizierten Gene assoziiert waren, ist Abbildung 3.9 zu entnehmen.

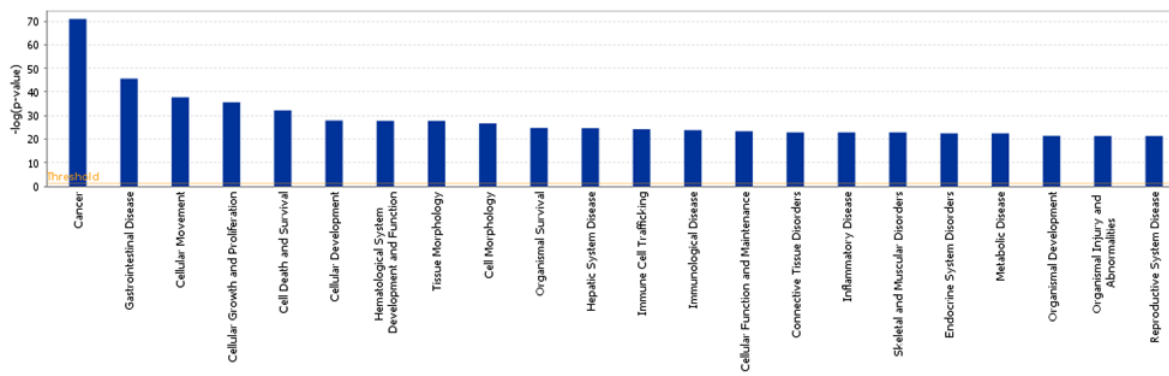


Abbildung 3.9 Liste der Krankheiten, die mit in dieser Methylierungsstudie identifizierten Genen assoziiert sind, der Häufigkeit der Assoziation nach sortiert.

Die meisten Gene, die eine aberrante Methylierung in CU-Patienten im Vergleich mit den Kontrollpersonen zeigten, sind mit Krebs und gastrointestinalen Erkrankungen assoziiert.

### 3.3 Selektive Resequenzierung der in der genomweiten Methylierungsanalyse auffälligen Gene mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung im gesamten Probenkollektiv

Aus den insgesamt über 3.000 auffälligen CpGs wurden fünf jeweils in einem Gen lokalisierte CpGs ausgewählt (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*), um die signifikant aberrante Methylierung in einem größeren Patientenkollektiv mittels Pyrosequenzierung zu bestätigen. Diese Gene wurde entweder aufgrund großer Methylierungsunterschiede zwischen CU-Patienten und Kontrollen oder bestehender Assoziation mit CED ausgewählt. Zusätzlich zu den CU-Proben wurden auch die MC TI- und MC Colon-Proben sowie die entsprechenden Kontrollproben mit analysiert. Für vier der fünf Gene (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4*) wurde jeweils eine einzelne CpG untersucht. Für *WIPF1* wurden zwei CpGs betrachtet, da diese in direkter Nachbarschaft zueinander lagen. Wie schon unter 3.1 beschrieben, wurden alle analysierten Proben in drei Patientengruppen (MC TI, MC Colon und CU Colon) und zwei Kontrollgruppen (K TI und K Colon) eingeteilt und die einzelnen Untergruppen (K, NE und E) untereinander verglichen (Tabelle 3.1, 3.2 und 3.3).

Die Ergebnisse der Methylierungsuntersuchung der K TI- (n=31), MC TI NE- (n=27) und MC TI E- (n=13) Proben sind in Abbildung 3.10 in Form von Boxplot-Graphiken dargestellt. Der Vergleich der drei Gruppen zeigte signifikante Methylierungsveränderungen für *STAT3*, *STAT4*, und *WIPF1*. Der Methylierungsgrad für *STAT3*, *STAT4* und *WIPF1* ist signifikant niedriger in MC TI E-Proben (Median=43,0 %, 39,0 % bzw. 18,0 %) als in K TI- ( $p=3,6 \cdot 10^{-8}$ ,  $p=0,003$ ;  $p=9,0 \cdot 10^{-6}$ , Median=59,5 %, 49,0 % bzw. 33,69 %) und MC TI NE-Proben ( $p=1,4 \cdot 10^{-7}$ ,  $p=0,015$ ;  $p=0,0011$ ; Median=57,0 %, 49,0 % bzw. 33,6 %). Für *BACH2* und *STK4* konnten keine Unterschiede in der Methylierung festgestellt werden. Alle p-Werte und Methylierungswerte (Median) der beschriebenen Vergleiche sind in den Tabellen 3.10 und 3.11 angegeben.

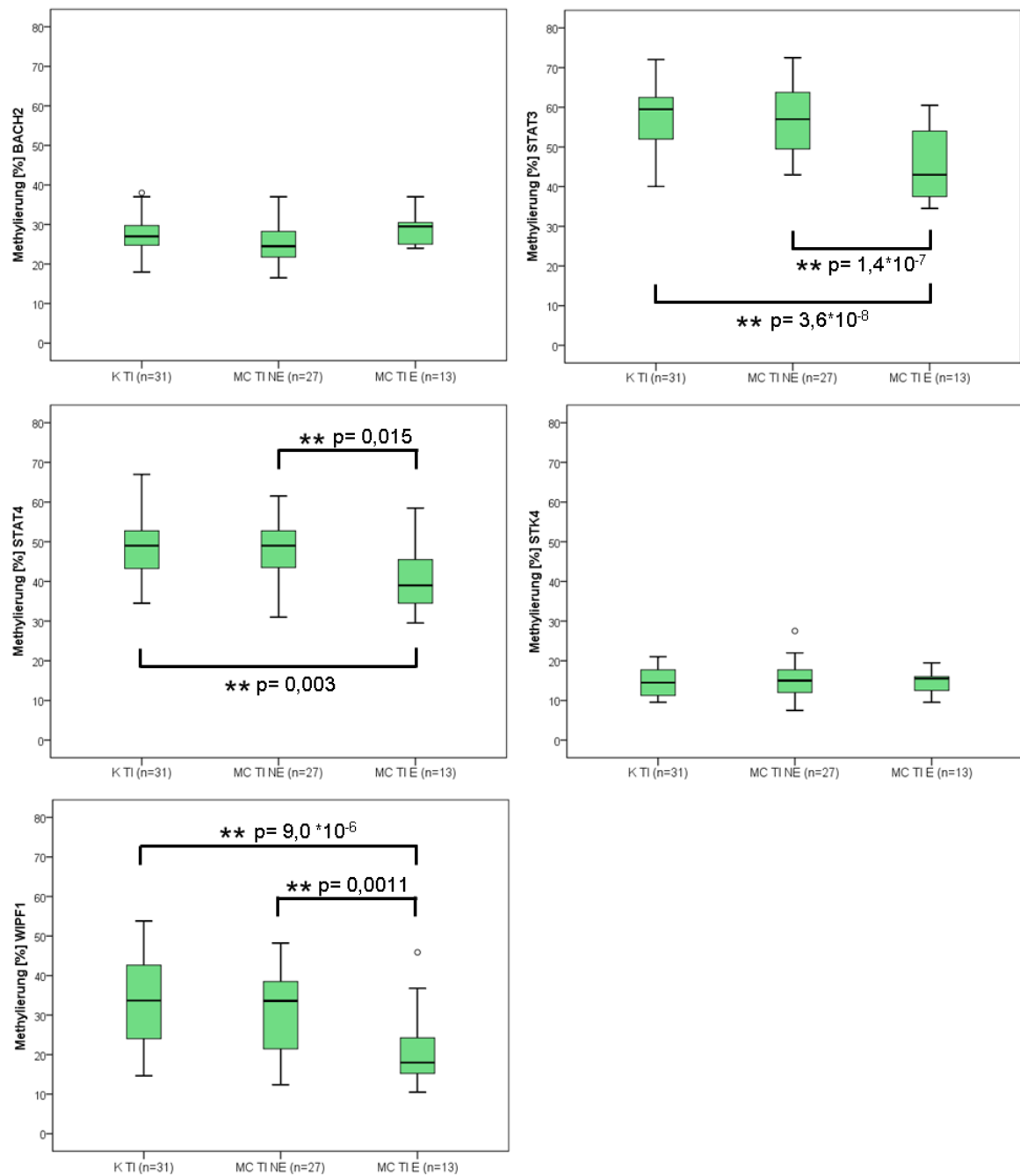


Abbildung 3.10 Methylierung in [%] von *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1* gemessen in terminalem Ileum-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden Kontrollpersonen. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.

Tabelle 3.10 p-Werte der Vergleiche der MC TI NE-, MC TI E.-und TI Kontrollproben für *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte	<i>BACH2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT4</i>	<i>STK4</i>	<i>WIPF1</i>
K TI MC TI NE	0,24	0,68	0,53	0,87	0,12
K TI MC TI E	0,84	<b>3,6E-08</b>	<b>0,003</b>	0,49	<b>9,0E-06</b>
MC TI NE MC TI E	0,26	<b>1,4E-07</b>	<b>0,015</b>	0,40	<b>0,0011</b>

Tabelle 3.11 Methylierung (Median) der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*.

Median [%]	<i>BACH2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT4</i>	<i>STK4</i>	<i>WIPF1</i>
K TI	27,0	59,5	49,0	14,5	33,7
MC TI NE	24,5	57,0	49,0	15,0	33,6
MC TI E	29,5	43,0	39,0	15,5	18,0

Die Methylierungswerte der Validierung für die K Colon- (n=47), MC Colon NE- (n=40) und MC Colon E- (n=18) Proben sind in Abbildung 3.11 dargestellt. Alle fünf untersuchten Gene (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*) zeigten eine signifikant verminderte Methylierung der E- und NE-Proben gegenüber den Colon Kontrollproben. Darüber hinaus liegt eine signifikant niedrigere Methylierung aller Gene in den MC Colon E-Proben im Vergleich mit den MC Colon NE-Proben vor.

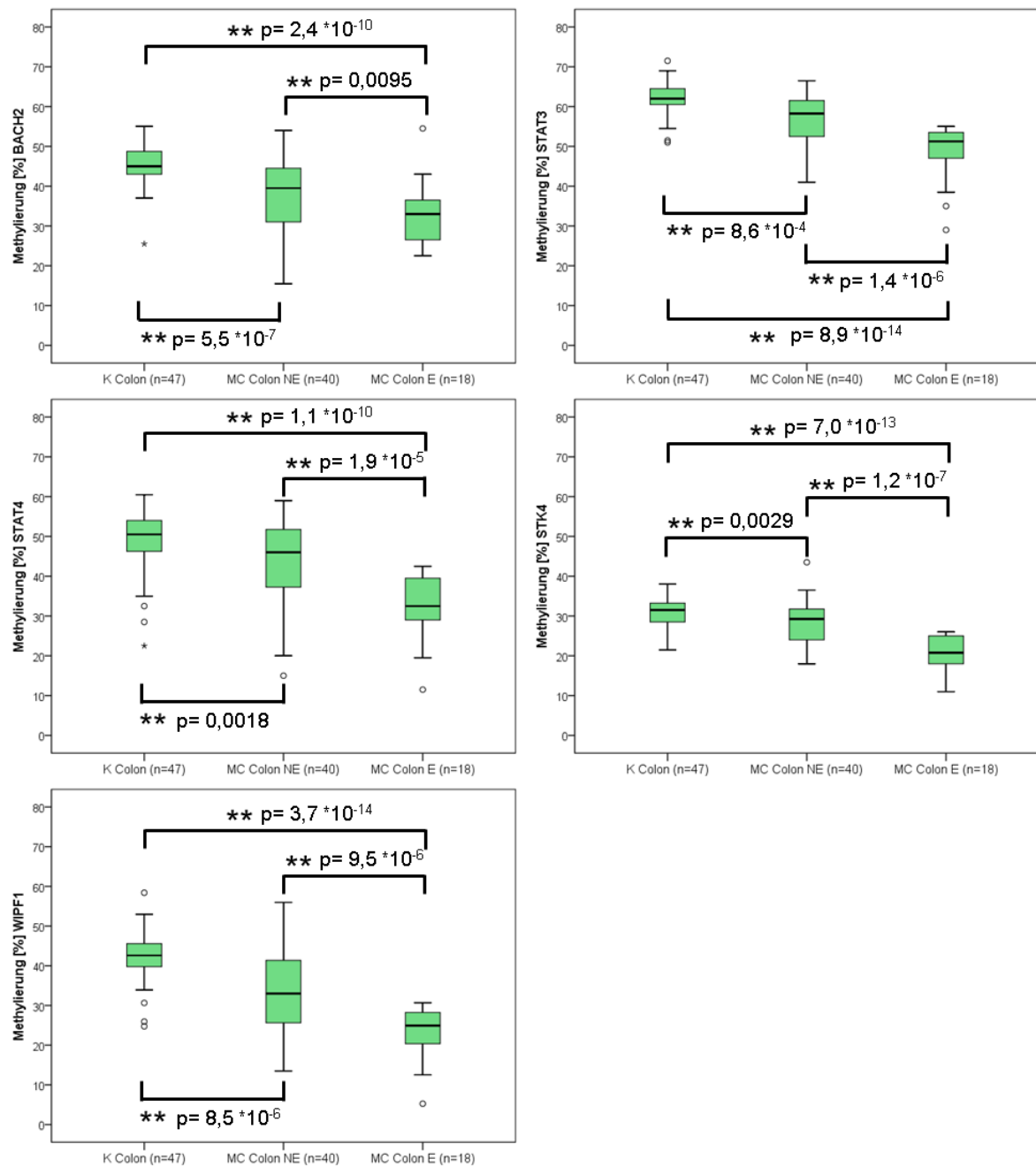


Abbildung 3.11 Methylierung in [%] von *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1* gemessen im Colon-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.

Die größten Methylierungsunterschiede ( $\sim 20\%$ ) wurden für *WIPF1* im Vergleich der MC Colon E- mit den K Colon-Proben identifiziert. Die p-Werte aller Vergleiche sowie die Methylierungswerte (Median) der einzelnen Gruppen sind den Tabellen 3.12 bzw. 3.13 zu entnehmen.

Tabelle 3.12 p-Werte der Vergleiche der MC Colon NE- und MC Colon E- und Colon-Kontrollproben für *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*.

<b>p-Werte</b>	<b><i>BACH2</i></b>	<b><i>STAT3</i></b>	<b><i>STAT4</i></b>	<b><i>STK4</i></b>	<b><i>WIPF1</i></b>
<b>K Colon MC Colon NE</b>	<b>5,5E-07</b>	<b>8,6E-04</b>	<b>0,0018</b>	<b>0,0029</b>	<b>8,5E-06</b>
<b>K Colon MC Colon E</b>	<b>2,4E-10</b>	<b>8,9E-14</b>	<b>1,1E-10</b>	<b>7,0E-13</b>	<b>3,7E-14</b>
<b>MC Colon NE MC Colon E</b>	<b>9,5E-03</b>	<b>1,4E-06</b>	<b>1,90E-05</b>	<b>1,2E-07</b>	<b>9,5E-06</b>

Tabelle 3.13 Methylierung (Median) der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*.

<b>Median [%]</b>	<b><i>BACH2</i></b>	<b><i>STAT3</i></b>	<b><i>STAT4</i></b>	<b><i>STK4</i></b>	<b><i>WIPF1</i></b>
<b>K Colon</b>	45,0	62,0	50,5	31,5	42,6
<b>MC Colon NE</b>	39,5	58,3	46,0	29,3	33,0
<b>MC Colon E</b>	33,0	51,3	32,5	20,8	24,9

Die höchsten Methylierungsunterschiede zeigte der Vergleich der Colon-Proben von CU-Patienten Proben mit denen von Kontrollpersonen (Abbildung 3.12). Alle fünf untersuchten Gene (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*) zeigten eine signifikant verminderte Methylierung der CU Colon E- und CU Colon NE-Proben im Vergleich mit den Colon-Proben von Kontrollpersonen. Darüber hinaus liegt eine signifikant niedrigere Methylierung aller Gene in den CU Colon E-Proben im Vergleich zu den CU Colon NE-Proben vor.

Die größten Methylierungsunterschiede (>20 %) wurden für *BACH2* und *WIPF1* im Vergleich der CU Colon E- mit den K Colon-Proben identifiziert. Die p-Werte aller Vergleiche sowie die Methylierungswerte (Median) der einzelnen Gruppen können den Tabellen 3.14 bzw. 3.15 entnommen werden.

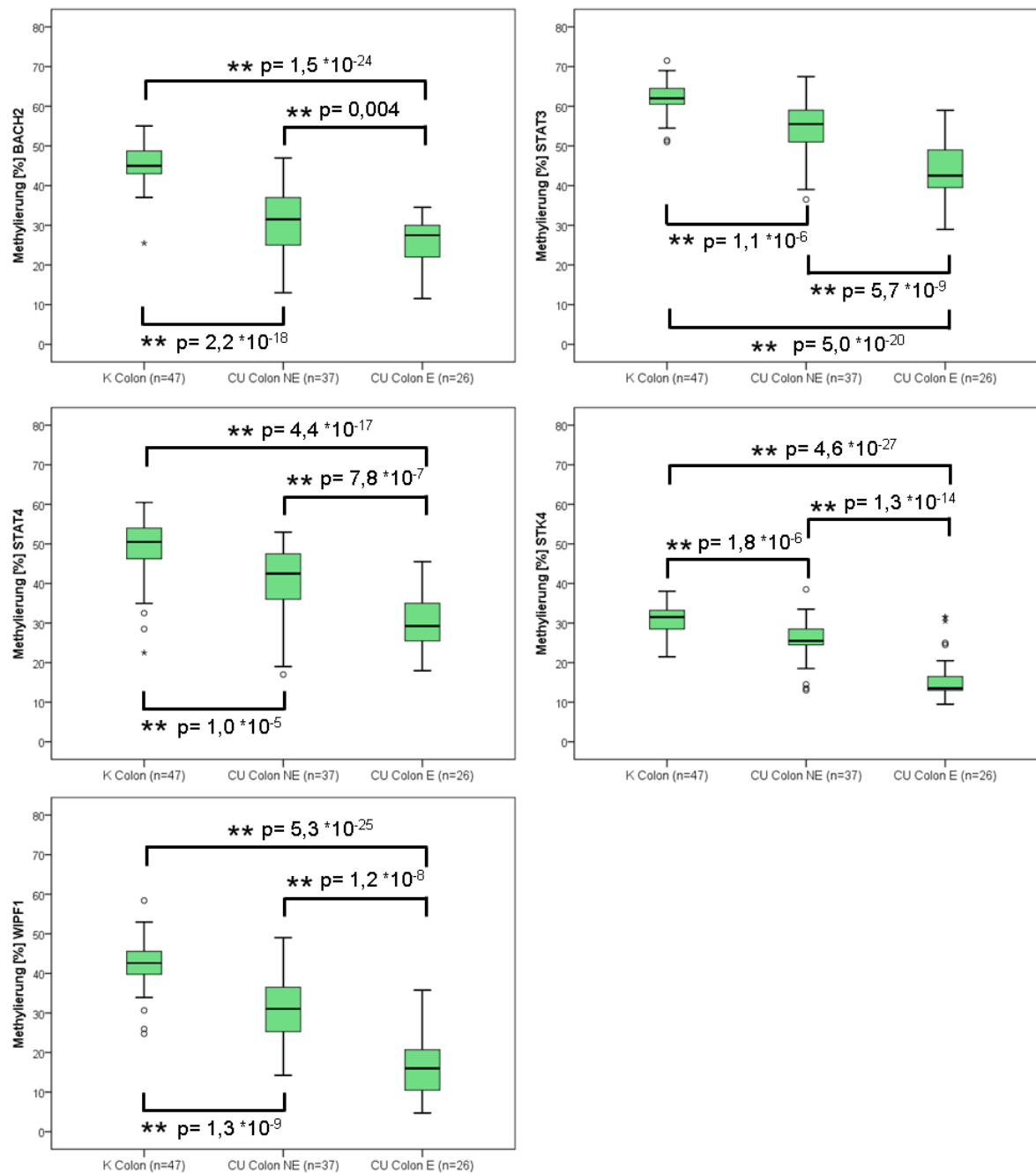


Abbildung 3.12 Methylierung in [%] von *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1* gemessen im Colon-Gewebe von CU-Patienten und entsprechenden Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.



Tabelle 3.14 p-Werte der Vergleiche der CU Colon NE-, CU Colon E- und Colon-Kontrollproben für *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*.

p-Werte	<i>BACH2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT4</i>	<i>STK4</i>	<i>WIPF1</i>
K Colon CU NE	2,2E-18	1,1E-06	1,0E-05	1,8E-06	1,3E-09
K Colon CU E	1,5E-24	5E-20	4,4E-17	4,6E-27	5,3E-25
CU NE CU E	0,004	5,77E-09	7,8E-07	1,3E-14	1,2E-08

Tabelle 3.15 Methylierung (Median) der CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*.

Median [%]	<i>BACH2</i>	<i>STAT3</i>	<i>STAT4</i>	<i>STK4</i>	<i>WIPF1</i>
K Colon	45,0	62,0	50,5	31,5	42,6
MC Colon NE	31,5	55,5	42,5	25,5	31,0
MC Colon E	26,1	42,5	29,3	13,5	16,0

### 3.4 Validierung des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung der mit dem BeadChip untersuchten Proben

Um die Methylierungswerte, die für die jeweiligen CpGs mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip generiert wurden, zu verifizieren, wurden die gleichen Positionen nur für die mit dem BeadChip untersuchten Proben ebenfalls mit Bisulfit-Pyrosequenzierung überprüft. Die mittels BeadChip und Pyrosequenzierung ermittelten Methylierungswerte der einzelnen Probengruppen (K Colon, CU Colon NE und CU Colon E) sind in Tabelle 3.16 einander gegenüber gestellt.

Für alle fünf untersuchten Gene konnten die gleichen Tendenzen festgestellt werden, d.h. sowohl mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip als auch mittels Pyrosequenzierung wurde eine verminderte Methylierung in den CU Colon E-Proben gegenüber den Colon-Kontrollproben nachgewiesen. *WIPF1* zeigte nur wenige Prozent (<6%) Abweichung zwischen den Methylierungswerten für die beiden Methoden. Für alle andere Gene wurde moderate Abweichung von <10% festgestellt. Auffallend ist, dass für alle Gene bis auf *STAT3* die mittels

Pyrosequenzierung generierten Werte niedriger als die mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip generierten Werte waren.

Tabelle 3.16 Vergleich der mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip und mittels Pyrosequenzierung generierten Methylierungswerte der fünf untersuchten Gene (*STK4*, *WIPF1*, *STAT3*, *BACH2* und *STAT3*) für alle drei Untergruppen (K Colon, CU Colon NE und CU Colon E).

Methylierung [%]		K Colon (n=8)	CU NE (n=8)	CU E (n=8)
<b><i>STK4</i></b>	BeadChip	37,48	35,31	20,93
	Pyro	30,94	30,88	13,19
<b><i>WIPF1</i></b>	BeadChip	47,19	40,21	15,34
	Pyro	41,54	37,19	16,76
<b><i>STAT4</i></b>	BeadChip	57,82	52,11	34,82
	Pyro	50,06	45,06	26,88
<b><i>BACH2</i></b>	BeadChip	51,20	43,13	27,09
	Pyro	44,94	35,63	21,88
<b><i>STAT3</i></b>	BeadChip	55,53	53,50	40,96
	Pyro	61,00	59,63	40,64

### 3.5 Expressionsuntersuchung von sechs Kandidatengen in intestinalen Gewebebiopsien mittels quantitativer qRT-PCR

Anhand der genspezifischen- und der genomweiten Methylierungsanalysen mit anschließender Resequenzierung wurden neun Kandidatengene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *MUC15*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*) identifiziert, die ein aberrantes Methylierungsmuster der regulatorischen Bereichen in Proben von MC- oder CU- Patienten im Vergleich zu den Proben von gesunden Kontrollpersonen aufwiesen. Sechs (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) der neun Kandidatengene wurden ausgewählt, um mittels qRT-PCR eine mögliche Auswirkung der veränderten Methylierung auf die Genexpression auf mRNA-Ebene zu überprüfen. Auswahlkriterien für die Gene waren zum einen möglichst große Methylierungsunterschiede in allen drei Gruppen (MC TI, MC Colon und CU Colon) sowie eine bereits beschriebene Assoziation mit CED.

Da die Menge entnommenen Gewebes sehr limitiert war, konnte nur von ca. 1/3 der Patienten und Kontrollen sowohl DNA also auch RNA isoliert werden. Die Anzahl der zu untersuchenden Proben war für die Expressionsuntersuchungen demnach geringer als für die Methylierungsanalysen. Eine geringe Probenanzahl kann zur Folge haben, dass manche Unterschiede nicht als signifikant detektiert

werden. Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, wurden in den folgenden Abbildungen neben den signifikanten (schwarz) auch eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede (grau) hervorgehoben.

Zur Normalisierung der gemessenen mRNA-Menge der Kandidatengene wurde die mRNA-Expression von zwei endogenen Kontrollgenen (*PPIA* und *B2M*) ebenfalls mittels qPCR analysiert. Während der Auswertung stellte sich heraus, dass *B2M* nicht für alle analysierten Proben stabile Ct-Werte lieferte. Um ein dadurch bedingtes Verfälschen der Ergebnisse zu vermeiden, wurde nur *PPIA* als Referenzgen für die Normalisierung verwendet und auf eine Normalisierung mit *B2M* verzichtet. Alle dCt-Werte der folgenden Abbildungen sind demnach nur durch Normalisierung mit der nachgewiesenen *PPIA* mRNA Menge generiert worden.

Wie schon zuvor in den Methylierungsuntersuchungen wurden alle Proben in drei Patientengruppen (MC TI, MC Colon und CU Colon) und zwei Kontrollgruppen (K TI und K Colon) eingeteilt und innerhalb der Gruppen die verschiedenen Untergruppen (K, NE und E) miteinander verglichen (Tabellen 3.1; 3.2 und 3.3).

### **3.5.1 Expressionsanalysen von Gewebeproben des terminalen Ileum von MC-Patienten**

Abbildung 3.13 zeigt die dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*), welche für den Vergleich der Gewebeproben MC TI NE (n=12), MC TI E (n=4) und K TI (n=13) untereinander ermittelt wurden. Die dCt-Werte geben direkten Rückschluss auf die Expression der Gene. Somit lassen niedrige- bzw. hohe dCt-Werte auf ein hohes bzw. geringes Maß der Expression schließen.

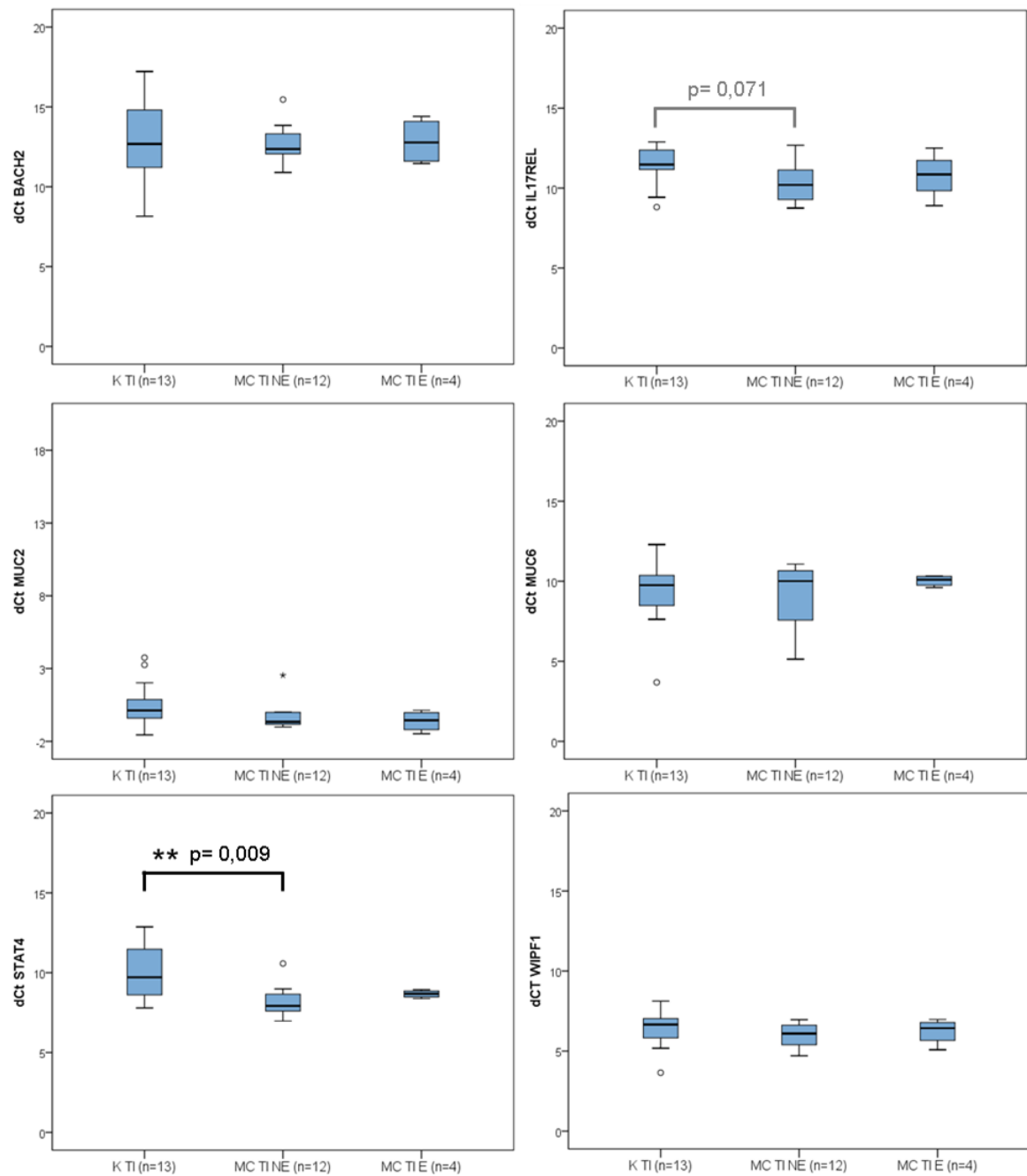


Abbildung 3.13 dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) in den MC TI NE- (n=12) und MC TI E- (n=4) Gewebeproben sowie TI-Kontrollproben (n=13). Je niedrigerer der dCt-Wert desto höher die Expression des entsprechenden Gens. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs, graue Klammern mit p-Werten  $> 0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich.

Eine signifikant erhöhte *STAT4*-Expression war in MC TI NE-Proben (Median=7,9) gegenüber den K TI-Proben ( $p=0,009$ ; Median=9,7) zu beobachten. Ein eindeutiger, aber nicht signifikanter Anstieg der Expression wurde für *IL17REL* in

NE TI-Proben (Median=10,1) im Vergleich mit den K TI-Proben ( $p=0,071$ ; Median=11,4) detektiert. *BACH2*, *MUC2*, *MUC6* und *WIPF1* zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen MC TI-Proben und K TI-Proben. Alle p-Werte sind in Tabelle 3.17 angegeben.

Tabelle 3.17 p-Werte der Expressionsvergleiche der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte (Expression)	<i>BACH2</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>STAT4</i>	<i>WIPF1</i>
K TI MC TI NE	0,91	0,071	0,26	0,96	<b>0,009</b>	0,54
K TI MC TI E	0,99	0,66	0,25	0,80	0,18	0,93
MC TI NE MC TI E	0,99	0,72	0,88	0,69	0,88	0,91

### 3.5.2 Expressionsanalysen von Gewebeproben des Colon von MC-Patienten

Der Vergleich der zweiten Gruppe (K Colon  $n=24$ , MC Colon NE  $n=25$  und MC Colon E  $n=9$ ) ergab signifikante Expressionsunterschiede für drei der sechs untersuchten Gene (*IL17REL*, *MUC6* und *STAT4*) (Abbildung 3.14). Die *IL17REL*-Expression ist signifikant niedriger sowohl in den MC Colon NE-Proben ( $p=0,0026$ ; Median=13,0) als auch in den MC Colon E-Proben ( $p=0,047$ ; Median=12,1) gegenüber den K Colon-Proben (Median=10,0). Ein leichter, nicht signifikanter Unterschied wurde auch zwischen den MC Colon NE-Proben und den MC Colon E-Proben beobachtet ( $p=0,075$ ). Die MC Colon E-Proben wiesen eine höhere Expression als die MC Colon NE-Proben auf, die aber immer noch signifikant unter der Expression der Colon Kontrollproben lag.

Für *MUC6* ( $p=0,013$ ) und *STAT4* ( $p=0,025$ ) konnte ebenfalls eine verringerte Expression in den MC Colon NE-Proben (Median=10,0 bzw. 12,1) gegenüber den Kontrollproben (Median=8,5 bzw. 10,0) festgestellt werden. Die anderen Vergleiche ergaben keine signifikanten Unterschiede. Die dazugehörigen p-Werte können Tabelle 3.17 entnommen werden.

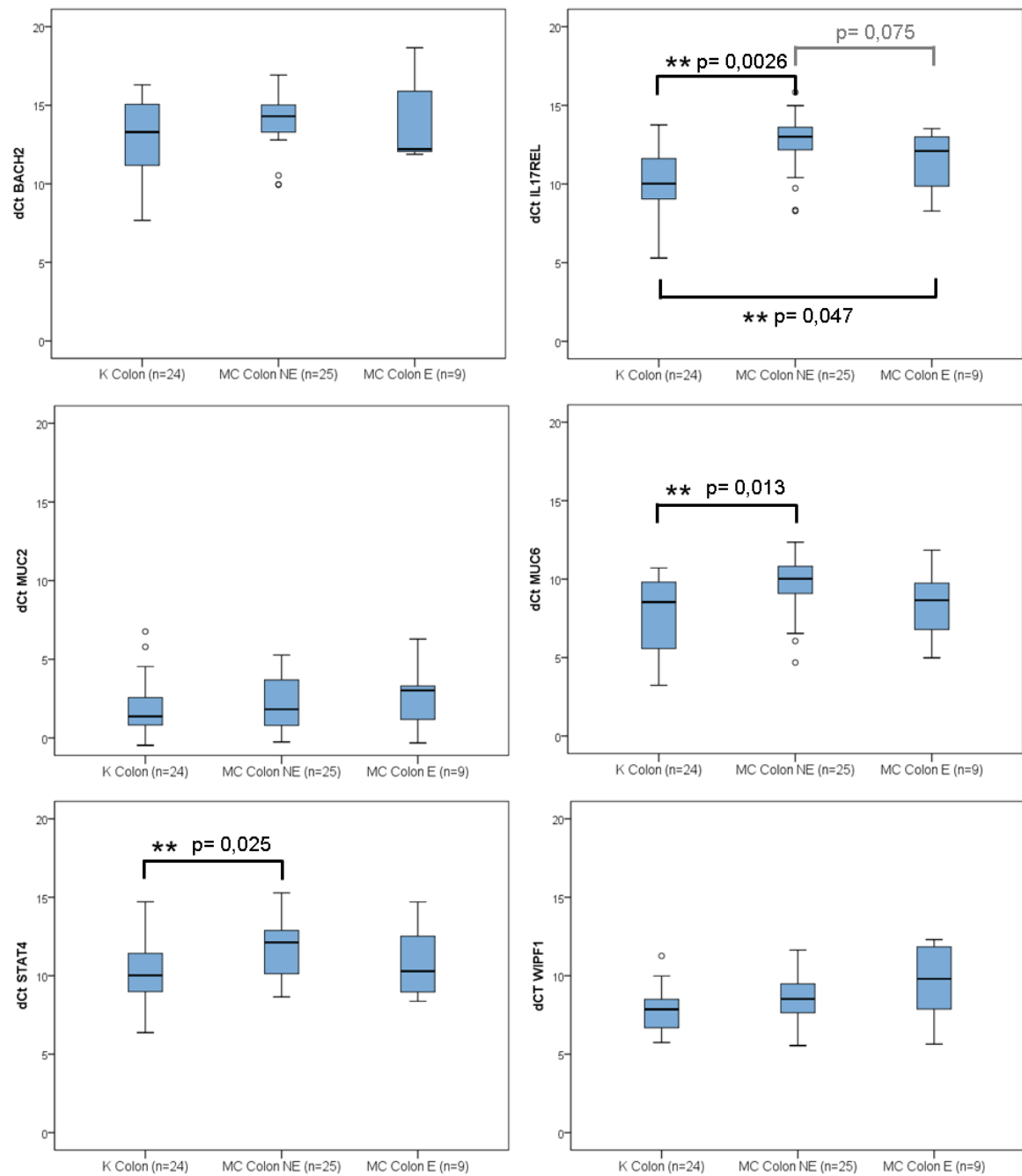


Abbildung 3.14 dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) in den MC Colon NE- (n=25) und MC Colon E- (n=9) Gewebeproben sowie den Colon-Kontrollproben (n=24). Je niedrigerer der dCt-Wert desto höher die Expression des entsprechenden Gens. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs an, graue Klammern mit p-Werten  $> 0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich.

Tabelle 3.18 p-Werte der Expressionsvergleiche der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte (Expression)	<i>BACH2</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>STAT4</i>	<i>WIPF1</i>
K Colon MC Colon NE	0,37	<b>0,00026</b>	0,72	<b>0,013</b>	<b>0,025</b>	0,37
K Colon MC Colon E	0,60	<b>0,047</b>	0,93	0,79	0,80	0,31
MC Colon NE MC Colon E	0,99	0,075	0,96	0,33	0,45	0,88

### 3.5.3 Expressionsanalysen von Gewebeproben des Colon von CU-Patienten

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen der dritten Gruppe (K Colon n=24, CU Colon NE n=23 und CU Colon E n=12) zeigten eine erhöhte *MUC2*-Expression in CU Colon E-Proben ( $p=0,044$ ; Median=-0,2) gegenüber den Colon-Kontrollproben (Median=1,3). Für alle weiteren analysierten Gene waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Die p-Werte sind in Tabelle 3.18 zusammengefasst.

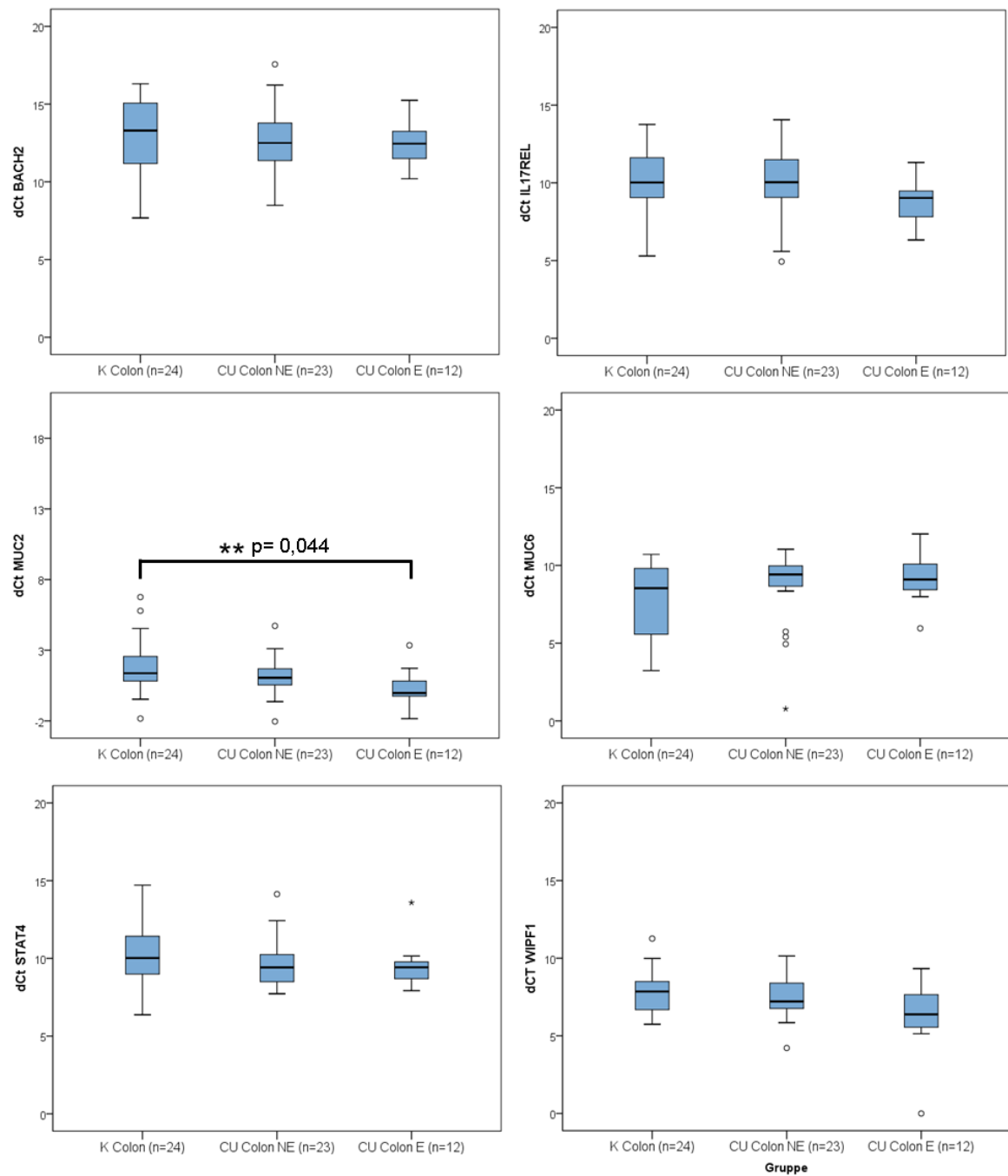


Abbildung 3.15 dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) in den CU Colon NE- (n=23) und CU Colon E- (n=12) Gewebeproben sowie den Colon-Kontrollproben (n=24). Je niedrigerer der dCt-Wert desto höher die Expression des entsprechenden Gens. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $\leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.



Tabelle 3.19 p-Werte der Expressionsvergleiche der CU NE- CU E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte (Expression)	<i>BACH2</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>STAT4</i>	<i>WIPF1</i>
K Colon CU NE	0,82	1,00	0,28	0,26	0,60	0,53
K Colon CU E	0,81	0,23	<b>0,044</b>	0,21	0,54	0,10
CU NE CU E	0,98	0,22	0,40	0,89	0,95	0,37

Sowohl für die genspezifischen Methylierungsanalysen als auch für die Resequenzierung der im Array auffälligen CpGs mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde das gesamte Probenkollektiv untersucht. Die Expressionsanalysen wurden hingegen nur mit einem Teil der Proben durchgeführt. Daher sind in den folgenden Abbildungen nur für die Gene mit auffälligen Expressionswerten (*IL17REL*, *MUC2*, *MUC6* und *STAT4*) die Expressionswerte den in denselben Proben gemessenen Methylierungswerten gegenübergestellt.

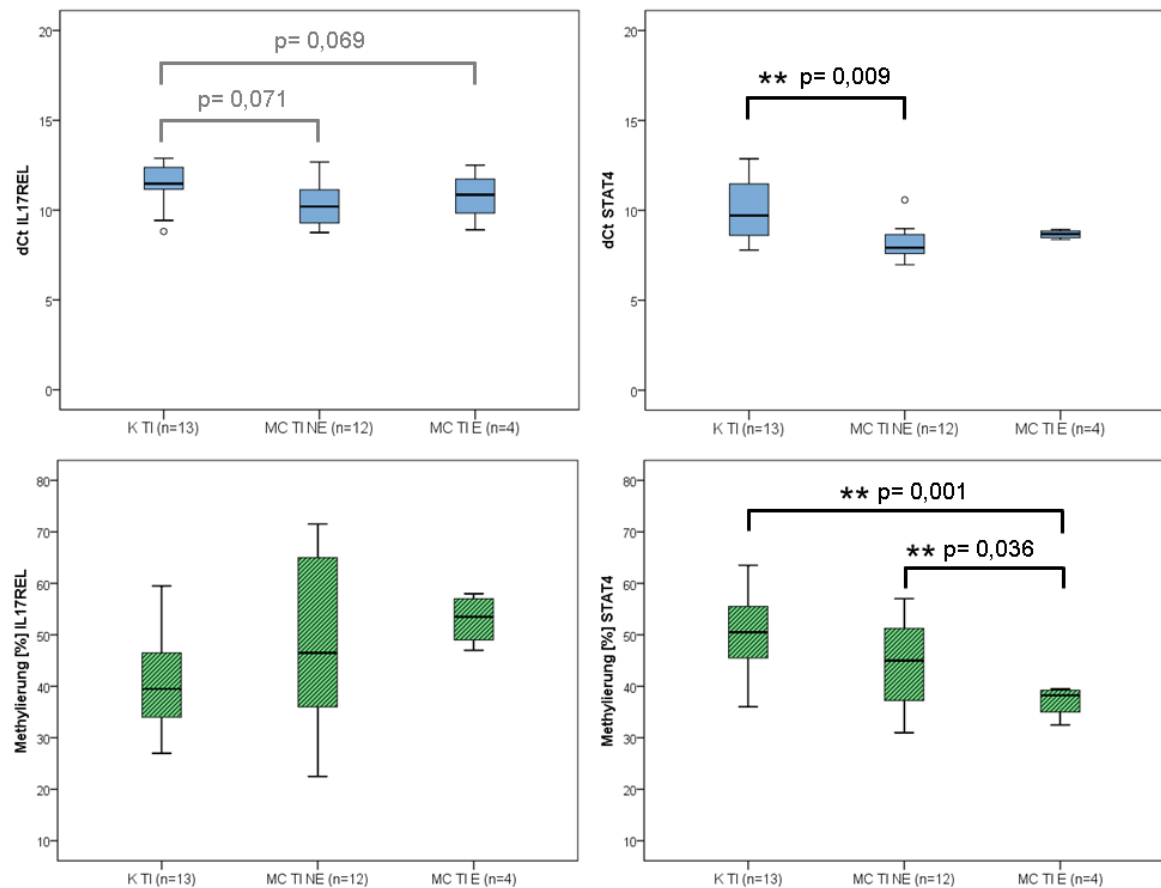


Abbildung 3.16 Ergebnisse der Expressionsanalysen (oben) und Methylierungsanalysen (unten) von *IL17REL* und *STAT4* in denselben MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs, graue Klammern mit p-Werten  $> 0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich.

Abbildung 3.16 zeigt die Expression und die Methylierung von *IL17REL* und *STAT4* in MC TI NE- (n=12), MC TI E- (n=4) und K TI- (n=13) Proben. Dabei sind nur die Werte der Proben, aus denen DNA und RNA isoliert werden konnte, dargestellt. Wie schon vorher beschrieben ist eine leichte, nicht signifikante ( $p=0,071$ ) Erhöhung der *IL17REL*-Expression in den MC TI NE-Proben zu beobachten. Die *IL17REL*-Promotermethylierung ist ebenfalls leicht, aber nicht signifikant in den MC TI NE- und MC TI E-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben angestiegen. *STAT4* zeigt für die MC TI NE-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben eine signifikant erhöhte Expression sowie für die MC TI E-Proben eine signifikant verminderte Methylierung gegenüber den K TI- und MC TI NE-Proben. Die p-Werte der anderen Vergleiche und Gene sind in Tabelle 3.20 dargestellt. Der Vergleich der Methylierungsanalyse des Gesamt- und des Teilkollektivs zeigte, dass für alle Gene die Tendenzen gleich waren und dass für

*BACH2*, *IL17REL*, *MUC6* und *STAT4* die p-Werte ähnlich waren oder eine höhere Signifikanz in den Vergleichen des gesamten Kollektiv zeigten (Tabellen 3.4, 3.10 und 3.20). Für *MUC2* und *WIPF1* wurden in der Auswertung des Teilkollektivs signifikante Methylierungsveränderungen in den MC TI NE- und MC TI E-Proben detektiert, die in der Auswertung des Gesamtkollektivs nicht signifikant waren.

Tabelle 3.20 p-Werte der Methylierungsvergleiche der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Diese Werte beziehen sich auf die Daten des Teilkollektivs, bestehend aus den Patienten, aus deren Gewebe sowohl RNA als auch DNA isoliert werden konnte. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte (Methylierung)	<i>BACH2</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>STAT4</i>	<i>WIPF1</i>
K TI MC TI NE	0,93	0,10	<b>0,017</b>	0,25	0,11	<b>0,007</b>
K TI MC TI E	0,39	0,069	<b>0,003</b>	0,10	<b>0,001</b>	<b>2,1E-05</b>
MC TI NE MC TI E	0,40	0,51	0,18	0,44	<b>0,036</b>	<b>1,0E-04</b>

Der Vergleich der MC Colon NE-Proben mit den Colon-Kontrollproben ergab eine erniedrigte Expression für *IL17REL*, *MUC6* und *STAT4* (Abb. 3.17). Zusätzlich lag eine verringerte *IL17REL*-Expression in den MC Colon E-Proben vor. Die Methylierungsanalysen derselben Proben zeigte, dass die Methylierung von *IL17REL* und *MUC6* in den MC Colon E-Proben signifikant höher als in den Colon-Kontrollproben und MC Colon NE-Proben war. Für *STAT4* wurde eine signifikante Verringerung der Methylierung in den MC Colon E-Proben gegenüber den MC Colon NE-Proben und den Colon-Kontrollproben gemessen.

Im Allgemeinen zeigte der Vergleich (MC Colon NE, MC Colon E und K Colon) der Methylierungsanalyse des Gesamt- und des Teilkollektivs für alle Gene eine gleiche Tendenz des Methylierungsanstiegs oder -abfalls, wobei für die einzelnen Vergleiche des Gesamtkollektivs niedrigere p-Werte ermittelt wurden (Tabellen 3.6, 3.12 und 3.21).

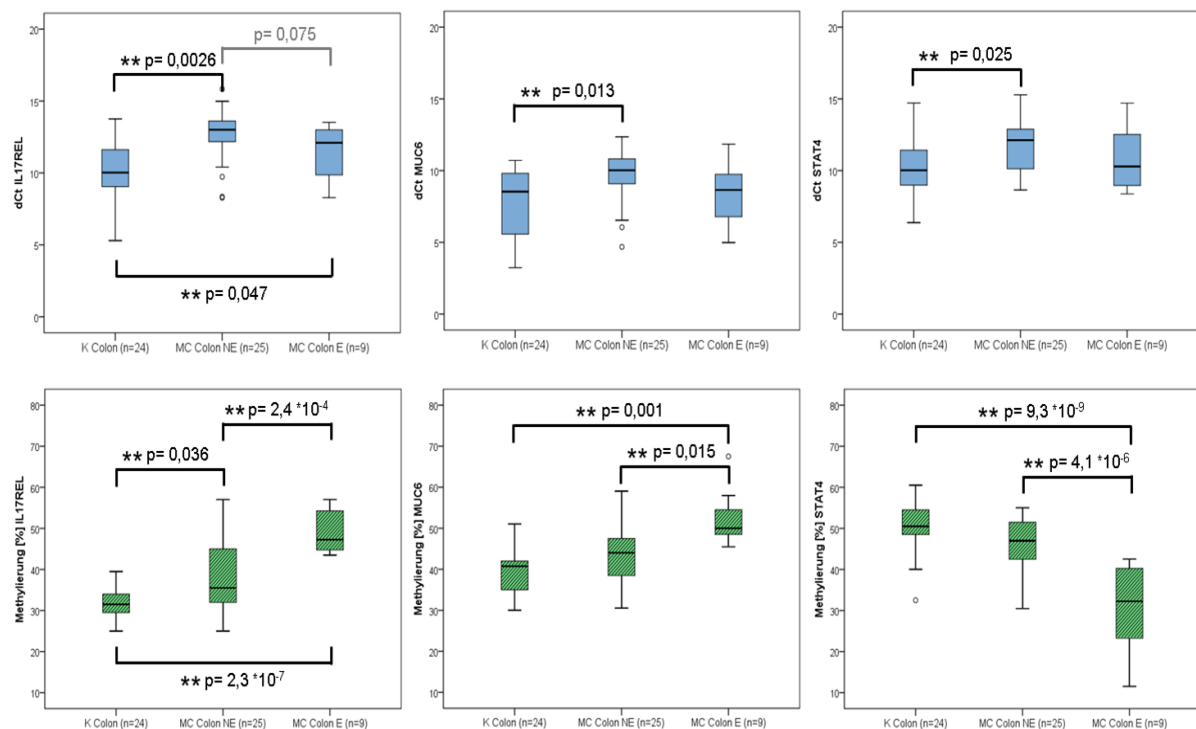


Abbildung 3.17 Ergebnisse der Expressionsanalysen (oben) und Methylierungsanalysen (unten) von *IL17REL*, *MUC6* und *STAT4* in denselben MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs, graue Klammern mit p-Werten  $> 0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich.

Tabelle 3.21 p-Werte der Methylierungsvergleiche der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Diese Werte beziehen sich auf die Daten des Teilkollektivs, bestehend aus den Patienten, aus deren Gewebe sowohl RNA als auch DNA isoliert werden konnte. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte (Methylierung)	<i>BACH2</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>STAT4</i>	<i>WIPF1</i>
K Colon MC Colon NE	<b>0,0069</b>	<b>0,059</b>	0,11	0,21	0,060	<b>1,0E-04</b>
K Colon MC Colon E	<b>8,7E-06</b>	<b>8,0E-06</b>	0,51	<b>0,001</b>	<b>9,3E-09</b>	<b>3,2E-08</b>
MC Colon NE MC Colon E	<b>0,0063</b>	<b>0,0014</b>	0,56	<b>0,015</b>	<b>4,1E-06</b>	<b>0,0032</b>

Der Vergleich der CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben ergab einen signifikanten Anstieg der *MUC2*-Expression in den CU Colon E-Proben gegenüber den Kontrollproben ( $p=0,044$ ) (Abb. 3.18). Die Methylierungsanalyse der entsprechenden Proben zeigte einen leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der *MUC2*-Methylierung in den CU Colon-Proben im Vergleich mit den Kontrollproben.

Die Analyse des gesamten Kollektivs ergab im Vergleich der CU Colon E-Proben mit den Kontrollproben einen signifikanten Anstieg der *MUC2*-Methylierung (Abb. 3.3, Tab. 3.8).

Im Allgemeinen zeigte der Vergleich (CU Colon NE, CU Colon E und K Colon) der Methylierungsanalyse des Gesamt- und des Teilkollektivs für alle Gene eine gleiche Tendenz des Methylierungsanstieg oder -abfalls, wobei für die einzelnen Vergleiche des Gesamtkollektivs niedrigere p-Werte ermittelt wurden (Tabellen 3.8, 3.14 und 3.22).

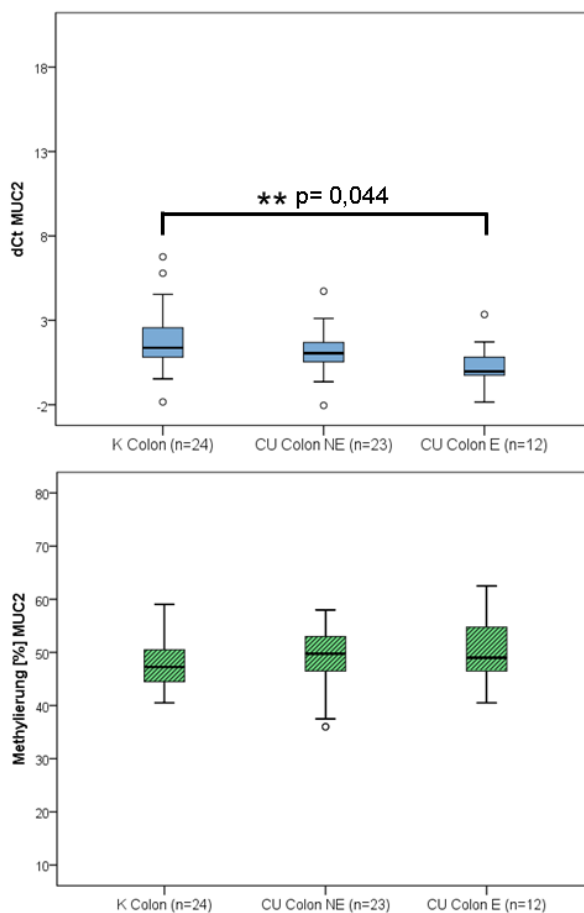


Abbildung 3.18 Ergebnisse der Expressionsanalysen (oben) und Methylierungsanalysen (unten) von *MUC2* in denselben CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.

Tabelle 3.22 p-Werte der Methylierungsvergleiche der CU NE-, CU E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Diese Werte beziehen sich auf die Daten des Teilkollektivs, bestehend aus den Patienten, aus deren Gewebe sowohl RNA als auch DNA isoliert werden konnte. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.

p-Werte (Methylierung)	<i>BACH2</i>	<i>IL17REL</i>	<i>MUC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>STAT4</i>	<i>WIPF1</i>
K Colon CU NE	<b>1,0E-09</b>	<b>0,036</b>	0,69	0,13	<b>4,1E-5</b>	<b>1,2E-07</b>
K Colon CU E	<b>7,4E-12</b>	<b>2,3E-07</b>	0,65	<b>0,001</b>	<b>1,5E-09</b>	<b>6,0E-12</b>
CU NE CU E	<b>0,029</b>	<b>2,4E-04</b>	0,88	<b>0,032</b>	<b>0,001</b>	<b>4,3E-04</b>

### 3.6 *IL17REL*-Promoteranalyse mittels Dual-Luciferase-Assay

*IL17REL* zeigte in den Methylierungs- und Expressionsanalysen die größten Unterschiede zwischen CED- und Kontrollproben. Der Promoter bzw. die regulatorischen Elemente von *IL17REL* sind in der Literatur noch nicht beschrieben. Daher wurden weitere Experimente zur Identifizierung und Charakterisierung der *IL17REL*-Promoterregion durchgeführt.

Für den Dual-Luciferase-Assay wurde der putative *IL17REL*-Promoter in drei verschiedene Abschnitte unterteilt. Das längste Insert (C1) hatte eine Länge von 798 bp und beinhaltete die in der DNA-Methylierungsuntersuchung analysierten CpGs. In den C2- und C3-Inserts (587 bp und 361 bp) sind die mittels Pyrosequenzierung analysierten CpGs nicht mehr enthalten.

Mittels Transfektion wurden die drei Konstrukte (pGL4.10-*IL17REL*-C1, pGL4.10-*IL17REL*-C2 und pGL4.10-*IL17REL*-C3) sowie der pGL4.10-Leervektor in HCT116-Zellen eingeschleust und mit einem Dual-Luciferase-Assays die Luciferase-Aktivität bestimmt. Das gemessene Firefly Luciferase-Signal wurde mittels einen co-transfizierten Renilla-Vektors und des daraus resultierenden Renilla Luciferase-Signals normalisiert. Die relative Luciferaseaktivität der drei Konstrukte wurde mit der Luciferase-Aktivität des pGL4.10-Leervektors verrechnet (Abbildung 3.19).

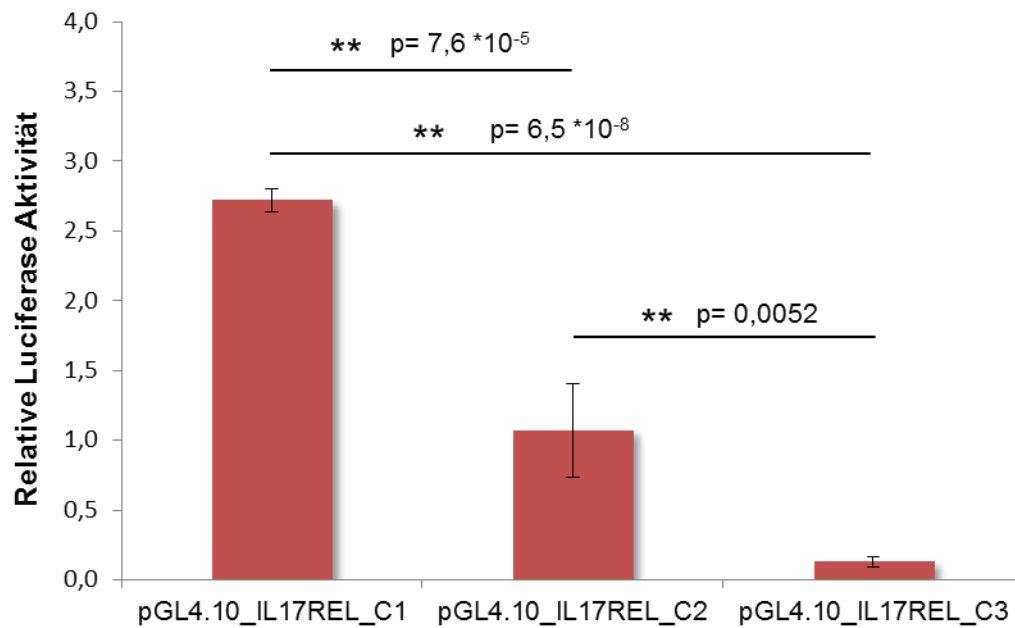


Abbildung 3.19 Relative Luciferase-Aktivität der drei analysierten Konstrukte (pGL4.10-*IL17REL\_C1*, pGL4.10-*IL17REL\_C2* und pGL4.10-*IL17REL\_C3*). Die Werte wurden mit dem pGL4.10-Leervektor verrechnet (nicht in Graphik dargestellt).

Tabelle 3.23 p-Werte der Vergleiche der relativen Luciferase-Aktivität von pGL4.10-*IL17REL\_C1*, pGL4.10-*IL17REL\_C2* und pGL4.10-*IL17REL\_C3*.

<b><i>IL17REL</i>-Konstrukte</b>	<b>p-Werte</b>
pGL4.10- <i>IL17REL_C1</i> pGL4.10- <i>IL17REL_C2</i>	7,6E-05
pGL4.10- <i>IL17REL_C1</i> pGL4.10- <i>IL17REL_C3</i>	6,5E-08
pGL4.10- <i>IL17REL_C2</i> pGL4.10- <i>IL17REL_C3</i>	0,0052

Die höchste relative Luciferase-Aktivität wurde für das längste Konstrukt C1 detektiert. Das um 211 bp gekürzte C2-Konstrukt zeigte eine signifikant verringerte Aktivität ( $p=7,6 \cdot 10^{-5}$ ) im Vergleich zum C1-Konstrukt. Eine Kürzung der putativen *IL17REL*-Promoterregion um weitere 225 bp (C3) führte zu einer noch stärkeren Verringerung der Luciferase-Aktivität im Vergleich mit C1 und C2. Alle p-Werte sind Tabelle 3.22 zu entnehmen. Somit scheint der Promoter-Abschnitt mit den in der Methylierungsuntersuchung analysierten CpGs wichtig für die Aktivität des *IL17REL*-Promoters zu sein.

## 4. Diskussion

Der Verlauf von CED wird maßgeblich durch eine aberrante Immunantwort auf das intestinale Mikrobiom in einem genetisch vorbelasteten Individuum bestimmt (Ventham et al. 2013). Bisher gab es verschiedene Herangehensweisen, um die Ursache für die Entstehung von CED auf molekularer Ebene zu untersuchen. Es wurden genomweite Assoziationsstudien durchgeführt, durch die krankheitsrelevante Mutationen in bestimmten Genen, z.B. *NOD2* und *IL17REL* identifiziert werden konnten (van Heel et al. 2005; Franke et al. 2010; Anderson et al. 2011). Darüber hinaus wurden durch die Erstellung von globalen Expressionsprofilen von CED-Geweben Gene ermittelt, deren veränderte Expression mit CED assoziiert sind, wie z.B. die Mucin-Gene (Moehle et al. 2006). In den letzten Jahren wurde auch eine Reihe von Studien veröffentlicht, die Methylierungsveränderungen bestimmter Gene im Gewebe oder Blut von CED-Patienten nachweisen konnten (Cooke et al. 2012; Lin et al. 2012; Nimmo et al. 2012). Allerdings gibt es nur wenige Studien, die Methylierungsveränderungen im Gewebe von CED-Patienten mit Expressionsunterschieden korrelieren konnten. In dieser Arbeit wurden Methylierungs- und Expressionsuntersuchungen an Gewebeproben von MC- und CU-Patienten sowie an gesundem Kontrollgewebe durchgeführt. Sowohl die genspezifischen als auch die genomweiten Methylierungsanalysen konnte eine Großzahl neuer Kandidatengene identifizieren. Für die vielversprechendsten Gene wurden darüber hinaus Expressionsanalysen mittels mRNA-Quantifizierung durchgeführt.

### 4.1 Das Patienten- und Kontrollkollektiv

Das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv (Tabelle 2.2 und 2.3) ist in Bezug auf Alter und Erkrankungsdauer recht heterogen, spiegelt jedoch den Durchschnitt an Erkrankten in der Bevölkerung wider. Da in dieser Studie nur Erwachsene eingeschlossen wurden, waren die jüngsten MC- und CU-Patienten 20 bzw. 21 Jahre alt. Im Alter zwischen 20 und 50 Jahren ist die Anzahl der Patienten homogen verteilt, d.h. im Bereich von 20-30 Jahren wurden ähnlich viele Patienten untersucht wie im Bereich von 30-40 oder 40-50 Jahren. Im Verhältnis dazu wurden weniger ältere Patienten (50-80 Jahre) in die Studie eingeschlossen. Die Erkrankungsdauer betrug bei etwa 1/3 der CU-Patienten 0-9 Jahre, bei 1/3 10-



19 Jahre und bei etwa 1/3 über 20 Jahre. Für die MC-Patienten wurde eine ähnliche Verteilung festgestellt, wobei die Gruppe mit 0-9 Erkrankungsjahren etwas größer war. Es konnten sowohl für MC als auch für CU deutlich mehr nicht-entzündliche als entzündliche Proben gesammelt werden. Ein Grund dafür ist, dass bei Vorliegen einer ohnehin schon geringen Anzahl an Patienten, denen eine Biopsie während eines akuten Schubs entnommen werden konnte, diese Entnahme eine durch die Entzündung der Darmschleimhaut häufig auftretende Kontaktblutungsneigung verstärkt. Daher wurde die Anzahl der entnommenen Biopsien bei Patienten mit starken Blutungen auf ein Minimum reduziert.

Wie aus der Übersicht aller Proben (Tabelle 2.2 und 2.3) zu entnehmen ist, ist das Durchschnittsalter der Kontrollpersonen, von denen terminales Ileum- bzw. Colon-Gewebeproben entnommen wurden, mindestens 10 Jahre höher als das der MC- und CU-Patienten. Die größte Anzahl der Kontrollpersonen war zwischen 50 und 70 Jahren alt. Ein Grund für das hohe Alter der Kontrollpersonen ist, dass viele der in diese Studie eingeschlossenen gesunden Probanden die für gewöhnlich ab einem Alter von 50 Jahren empfohlene Darmspiegelung zur Darmkrebsvorsorge nutzten.

Da der Fokus dieser Studie auf der Untersuchung von Methylierungsunterschieden lag, wurde aus dem entnommenen Material aller Proben zunächst DNA und aus dem verbleibenden Gewebe RNA isoliert. Da nur in etwa der Hälfte aller Proben ausreichend Gewebe vorhanden war, um DNA und RNA zu isolieren, ist die Anzahl der in der Expressionsanalyse untersuchten Proben deutlich geringer, als die in der Methylierungsanalyse.

#### **4.2 Genomweite Methylierungsuntersuchung intestinaler CU Gewebeproben**

Die genomweite Methylierungsanalyse der CU Colon NE- bzw. der CU Colon E-Proben im Vergleich zu den Colon-Kontrollproben identifizierte über 3000 aberrant methylierte CpGs. Um diese große Anzahl an Genen etwas genauer charakterisieren zu können, wurden die Gene bezüglich ihrer Rolle in bestimmten Signalwegen und ihrer Assoziationen mit verschiedenen Krankheitsbildern mit Hilfe der Ingenuity<sup>®</sup> Software (Qiagen) untersucht. Die Analyse ergab eine große Anzahl an Signalwegen, in denen die Gene mit einer veränderten Methylierung in CU-Patienten eine Rolle spielen (Abbildung 4.1). Die Mehrzahl der identifizierten

Signalwege ist im Rahmen von Entzündungsprozessen und Gewebeschäden aktiv, wie z.B. der Leukozyten-Extravasation-Signalweg, an dem 55 von insgesamt 198 Genen mit verändertem Methylierungsmuster in CED-Patienten beteiligt sind. Die Leukozyten-Extravasation beschreibt den Prozess, bei dem Leukozyten während einer Entzündungsreaktion aus dem Blut ins Gewebe wandern (Barreiro & Sánchez-Madrid 2009). Andere Signalwege mit einer wichtige Rolle in Entzündungsprozessen, in die eine signifikante Anzahl der in dieser Studie identifizierten Gene involviert ist, sind unter anderem der CD28-Signalweg in T-Helfer-Zellen, sowie der B- und T-Zell-Rezeptor-Signalweg und der Tec-Kinase-Signalweg. Da der größte Teil der differenziell methylierten Gene im Vergleich der Kontrollproben mit den CU Colon E-Proben detektiert wurde, erscheint es plausibel, dass ein Großteil der identifizierten Signalwege mit Entzündungsprozessen assoziiert ist. Andere Signalwege wie z.B. die Signaltransduktion der Rho-GTPasen, die wichtige Moleküle in der Regulation epithelialer Zellverbindungen (eng.: epithelial junctions) darstellen und damit zur Aufrechterhaltung der intestinalen Barrierefunktion beitragen (Citalán-Madrid et al. 2013), stehen im direkten Zusammenhang mit CED.

Der Signalweg, an dem anteilig die meisten in dieser Studie differenziell methylierten Gene (57/197), beteiligt sind, steuert die Aktivierung der Ito-Zellen in der Leber (engl.: Hepatic Fibrosis / Hepatic stellate cell activation). Die Aktivierung von Ito-Zellen wird bei Verletzungen der Leber, durch virale Infekte oder Entzündungen und durch zerstörte Hepatozyten angeregt (Yin et al. 2013). Die aktivierten Ito-Zellen bilden eine Art Narbe, um die Leber vor weiterer Zerstörung zu schützen, und schütten Zytokine und Wachstumshormone aus, um die Bildung neuer hepatischer Epithelzellen anzuregen. Da es in CED-Patienten neben der Entzündung im Darm auch zu eine Entzündung der Gallenwege und der Leber (Primär sklerosierende Cholangitis (PSC)) kommen kann (Rojas-Feria et al. 2013), ist ein gehäuftes Auftreten von Auffälligkeiten in Genen mit einer Rolle im Ito-Zellen aktivierenden Signalweg eine logische Konsequenz.

Neben ihrer Beteiligung an Signalwegen wurde für die in CU-Patienten differenziell methylierten Gene auch der Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitsbildern analysiert (Abbildung 3.9). Die beiden Krankheiten mit der höchsten Anzahl an assoziierten Genen waren Krebs und gastrointestinale Erkrankungen. Wie schon in der Einleitung beschrieben besteht bei CU-Patienten ein erhöhtes Risiko, an

Darmkrebs zu erkranken. Somit scheint die Beobachtung, dass einige mit Krebs assoziierte Gene nach langer Erkrankungsdauer und aktiver Entzündung Veränderungen in der Methylierung aufweisen, mit diesem Umstand übereinzustimmen. Ein möglicher Zusammenhang der aberranten Methylierung mit bestehenden Vorstufen einer möglicherweise einer Krebserkrankung vorausgehenden Dysplasie wäre Gegenstand weiterer Forschung.

Zudem findet sich für die differenziell methylierten Gene eine Assoziation mit weiteren im direkten Zusammenhang mit CED stehenden Erkrankungen, wie z.B. Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen.

Zusammenfassend kann die Durchführung der genomweiten Methylierungsuntersuchung intestinaler CU-Gewebeproben mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip als Erfolg gewertet werden. Es wurde eine große Anzahl an Genen identifiziert, die Methylierungsunterschiede in CU-Patienten aufwiesen und bestimmten mit CED assoziierten Signalwegen und Krankheitsbildern zugeordnet werden können. Durch die hohe Anzahl an auffälligen Genen ist eine genaue Analyse jedes einzelnen Gens nicht möglich. Es wurden daher exemplarisch für fünf besonders interessante Kandidatengene (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*) detailliertere Methylierungs- und Expressionsanalysen durchgeführt.

#### **4.3 Selektive Resequenzierung der in der genomweiten Analyse differenziell methylierten Gene mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung**

Aus den insgesamt über 3000 auffälligen Genen wurden fünf Gene aufgrund großer Methylierungsunterschiede zwischen CU-Patienten und Kontrollpersonen oder bestehender Assoziation mit CED ausgewählt (*BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1*), um die signifikant aberrante Methylierung gegenüber Kontrollpersonen in einem größeren Patientenkollektiv mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung zu bestätigen. Zusätzlich zu den CU-Proben wurden auch die MC TI-, und MC Colon-Proben sowie die entsprechenden Kontrollproben analysiert. Für alle untersuchten Gene konnten die Ergebnisse des Infinium® HumanMethylation450 BeadChip anhand der Ergebnisse der Pyrosequenzierung validiert werden. Der direkte Vergleich der Methylierungswerte (Mittelwerte) der sowohl mittels BeadChip als auch mittels Pyrosequenzierung untersuchten 24

ausgewählten Proben (Tabelle 3.17) zeigte, dass die Methylierungsveränderungen in CU-Patienten unabhängig von der Messmethode gleiche Tendenzen aufwiesen. In manchen Genen (z.B. *WIPF1*) betrug der Unterschied der Methylierungswerte im Vergleich beider Methoden nur wenige Prozent (<5 %). In anderen Genen (z.B. *BACH2* und *STAT4*) zeigten die mittels Pyrosequenzierung generierten Werte einen um ca. 5-10 % geringeren Methylierungsgrad. Neben methodenbedingten Schwankungen kommt als Ursache für diese Diskrepanz, auch eine höhere Präferenz der PCR-Primer für den unmethylierten DNA-Strang in Frage. Durch die Präferenz der PCR-Primer für den unmethylierten DNA-Strang wird dieser häufiger amplifiziert und die Gesamtmethylierung dieses Genabschnitts kann sich um einige Prozent nach unten verschieben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die genomweite Methylierungsanalyse mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip eine sehr gute Möglichkeit darstellt, um in einem kleineren Kollektiv erste Kandidatengene zu identifizieren. Die Pyrosequenzierung stellt eine Methode der Wahl dar, um Methylierungsunterschiede in genomweiten Studien zu validieren.

#### **4.4 Gene mit aberranter Methylierung in MC- und CU-Patienten**

Durch die genspezifische und genomweite Methylierungsanalyse von MC- und CU-Gewebeproben sowie der Kontrollproben konnten insgesamt neun Kandidatengene identifiziert werden. Drei dieser Kandidatengene (*MUC15*, *STAT3* und *STK4*) zeigten zwar signifikante Veränderungen der Methylierung in MC- oder CU-Patienten, weitere Expressionsanalysen wurden allerdings auf Grund nur geringer Veränderungen oder fehlender Assoziation mit CED nicht durchgeführt. Die Ergebnisse für diese drei Gene werden im Folgenden im Vergleich zu Daten aus der Literatur diskutiert.

##### **4.4.1 Mucin 15 (*MUC15*)**

*MUC15* gehört zu der Familie der Mucine, die neben Wasser, Kohlenhydraten, Salzen und Lipiden die strukturgebenden Bestandteile des im menschlichen Organismus vorkommenden Schleims bilden. Wie unter 1.2.2 beschrieben, ist das Darmepithel mit einer schützenden Schleimschicht überzogen, welche einen

wichtigen Bestandteil der Barrierefunktion des Darms darstellt. Mucine sind glykosylierte, fadenförmige Proteine, in deren Familie aktuell 21 Proteine bekannt sind.

MUC15 ist ein membrangebundenes Protein und spielt eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Signalweiterleitung, der Adhäsion, dem Zellwachstum und der Regulierung des Immunsystems (Singh & Hollingsworth 2006). Das *MUC15*-Gen ist auf Chromosom 11p14.3 lokalisiert.

In dieser Studie wurden geringe aber signifikante Methylierungsunterschiede im TI von MC-Patienten sowie im Colon von CU-Patienten im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollproben detektiert. Aktuell sind keine Studien veröffentlicht, die einen direkten Zusammenhang zwischen CED und aberranter *MUC15*-Promotermethylierung oder -Expression beschreiben. Eine erhöhte *MUC15*-mRNA-Expression ist allerdings in kolorektalen Karzinomen festgestellt worden (Huang et al. 2009). Entsprechende *in-vitro* Untersuchungen in der Studie von Huang et al. (2009) belegen zudem eine erhöhte Proliferationsrate in Colon-Krebszellen bei induzierter *MUC15*-Überexpression. Darüber hinaus wurde in derselben Studie eine Aktivierung der ERK-Phosphorylierung durch eine erhöhte *MUC15*-Expression beschrieben, welche das onkologische Potenzial für Colon-Krebszellen steigert.

In dieser Studie wurde im Vergleich mit Colon-Kontrollproben ein geringerer *MUC15*-Methylierungsstatus in Colon-Proben von CU-Patienten detektiert. Der Verlust der Methylierung in der Promoterregion kann zu einem Anstieg der Genexpression führen. Wie schon in der Einleitung beschrieben, besteht ein erhöhtes Risiko für CU-Patienten an Darmkrebs zu erkranken. Die veränderte Methylierung und die daraus resultierende erhöhte Expression in einigen Patienten könnte ein erster Indikator für eine mögliche Dysplasie oder spätere Krebserkrankung sein. Um diese These zu verifizieren, müssten zunächst Expressionsuntersuchungen für *MUC15* durchgeführt werden. Falls ein direkter Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression nachgewiesen werden kann, müsste das Patientenkollektiv um Patienten erweitert werden, bei denen eine Dysplasie bzw. ein kolorektales Karzinom vorliegt, um diese miteinander vergleichen zu können.

#### 4.4.2 Signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*)

Die derzeit bekannten sieben Mitglieder der STAT-Protein Familie sind Transkriptionsfaktoren, die durch Zytokine und Wachstumsfaktoren gesteuert werden. *STAT3* ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert und agiert als Akute-Phase-Protein, das durch Faktoren wie Interleukin-5 (IL5), Interleukin-6 (IL6), epidermale Wachstumsfaktoren und Leukämie-hemmenden Faktor aktiviert wird (Musso et al. 2005). Nach der Aktivierung wird *STAT3* phosphoryliert, was eine Dimerisierung des Proteins und die Migration zum Nucleus zur Folge hat. Dort wird die Transkription unterschiedlichster Gene, welche eine Rolle in den verschiedensten biologischen Abläufen, wie z.B. Zellwachstum, anti- oder pro-apoptischen Prozessen und Zellmotilität spielen (Sugimoto 2008), durch *STAT3* gesteuert.

Da bei CED ein Ungleichgewicht der mukosalen Zytokine vorliegt, spielen möglicherweise die STAT-Proteine eine zentrale Rolle in der Pathogenese von MC und CU. In verschiedenen Studien konnte ein Anstieg der Menge sowohl des phosphorylierten *STAT3* (p*STAT3*) als auch des gesamten *STAT3*-Proteins in T-Zellen sowie im Gewebe von MC- und CU-Patienten im Vergleich mit gesunden Individuen nachgewiesen werden (Lovato et al. 2003; Musso et al. 2005; Mudter et al. 2005).

In dieser Studie wurde eine verminderte *STAT3*-Methylierung im Gewebe von MC- (TI und Colon) und CU-Patienten im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgeweben festgestellt. Davon ausgehend, dass eine geringere Methylierung in regulatorisch wichtigen Regionen zu einer gesteigerten Expressionsrate des Gens führt, ist hier, wie schon in anderen Studien beschrieben, mit einem Anstieg der *STAT3* Expression in MC- und CU-Gewebe zu rechnen.

Die funktionelle Relevanz von *STAT3* wurde in zahlreichen murinen Studien untersucht. Da ein klassischer Knockout des *STAT3*-Gens schon in der frühen Embryonalphase letal ist (Takeda et al., 1997), wurden verschiedenste Zell-spezifische Knockout-Mäuse generiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein T-Zellen-spezifischer *STAT3*-Knockout zu einer beeinträchtigten T-Zell Proliferation führt (Takeda et al., 1998). Ein *STAT3*-Knockout in Knochenmarkszellen während der Hämatopoese bewirkt einen frühen Tod der Mäuse (4-6 Wochen) mit MC-ähnlicher Pathogenese einschließlich Infiltration von Entzündungszellen, Ulzeration und Darmwandverdickungen (Welte et al. 2003). Eine weitere Studie zeigte, dass die Aktivierung der IL-6/*STAT3*-Kaskade in T-Zellen der Lamina

propria zu einer Verlängerung der Lebensdauer von pathogenen T-Zellen führt, infolgedessen der Entzündungsprozess weiter angeregt wird (Atreya et al., 2010).

#### 4.4.3 Serine/Threonine Protein kinase 4 (*STK4*)

Das *STK4*-Gen, auch als *MST1* bekannt, kodiert für ein Protein der Familie der Serin/Threonin-Kinasen und ist auf Chromosom 20q13.12 lokalisiert. Das *STK4*-Protein kann sich selbst oder andere Proteine wie z.B. basische Myelin-Proteine oder Histon-Proteine phosphorylieren (Creasy & Chernoff 1995). Eine Studie beschreibt die Phosphorylierung von H2B an Position Ser14 durch *STK4*, wodurch der programmierte Zelltod aktiviert wird (Cheung et al. 2003). In Maus-Studien konnte gezeigt werden, dass ein *Stk4* Knockout zu einer reduzierten Anzahl von naiven T-Zellen sowohl in den sekundären Lymphorganen als auch im Blut führt (Oh et al. 2015). Darüber hinaus kommt es auch zu einem zunehmenden Verlust von B- und T-Lymphozyten, ausgelöst durch übermäßige Apoptose. *Stk4* hat in Säugetieren eine Tumorsuppressor-Funktion, die sich durch die Beschränkung der Zellproliferation und des Überlebens der Zellen auszeichnet (Song et al. 2010).

Mutationen im *STK4*-Gen sind mit einem T-Zell-Immundefekt assoziiert (Abdollahpour et al. 2012; Nehme et al. 2013). Der Funktionsverlust oder die Reduktion der Gen-Expression durch Mutationen führt in den betroffenen Patienten zu einer B- und T-Zell-Lymphopenie sowie zu Symptomen wie z.B. wiederkehrenden Infektionen der Haut und der Atemwege und Herpes simplex-Infektionen. Ein Zusammenhang zwischen *STK4*-Mutationen und CED wurde bisher noch nicht beschrieben.

In dieser Studie wurde eine signifikant verminderte *STK4*-Methylierung in Colon-Gewebeproben (NE und E) von MC- und CU-Patienten gegenüber den Colon-Kontrollproben identifiziert. Davon ausgehend, dass eine geringere Methylierung in regulatorisch wichtigen Regionen zu einer gesteigerten Expressionsrate des Gens führt, ist hier mit einem Anstieg der *STK4*-Expression im Colon-Gewebe von MC- und CU-Patienten zu rechnen.

Die Auswirkungen einer Überexpression von *STK4* wurden in einer Studie mit Leberzellkarzinom-Zellen (HepG2) beschrieben (Xu et al. 2013). Durch die Überexpression wird die Zellproliferation gehemmt und die Apoptose der HepG2-Zellen induziert.

Wie schon in der Einleitung beschrieben, besteht ein erhöhtes Risiko für CU-Patienten, an Darmkrebs zu erkranken. Die veränderte Methylierung, die daraus möglicherweise resultierende erhöhte Expression in einigen Patienten und die dadurch verstärkte tumorsuppressive Wirkung von *STK4* könnten ein erster Indikator für Vorstufen einer beginnenden Dysplasie oder späteren Krebserkrankung sein. Um diese These zu verifizieren, müssten zunächst Expressionsuntersuchungen für *STK4* durchgeführt werden. Falls ein direkter Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression nachgewiesen werden kann, müsste das Patientenkollektiv um Patienten erweitert werden, bei denen eine Dysplasie bzw. ein kolorektales Karzinom vorliegt.

#### **4.5 Gene mit aberranter Methylierung und unveränderter Genexpression in MC- und CU-Patienten**

##### **4.5.1 WAS/WASL-interacting protein family, member 1 (WIPF1)**

Das *WIPF1*-Gen, oder auch *WIP*, ist auf Chromosom 2q31.1 lokalisiert und kodiert für ein Protein der WAS/WASL-interacting Proteinfamilie. *WIPF1* wird sowohl in Immunzellen als auch in anderen Zellen wie z.B. Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert (Antón et al. 2002). Es dient der Stabilisierung von Aktinfilamenten und reguliert die Aktinpolymerisation.

Eine Mutation im *WIPF1*-Gen wurde in Verbindung mit dem Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) beschrieben (Lanzi et al. 2012), welches mit einer Insuffizienz der Blutgerinnung und des Immunsystems einhergeht. *Wipf1*-Knockout Mäuse (*Wipf1*<sup>-/-</sup>) entwickelten neben WAS-ähnlichen immunologischen Störungen auch eine schwere Colitis Ulcerosa (Curcio et al. 2007). Weitere Assoziationen von *WIPF1* mit CED sind nicht beschrieben.

In dieser Studie wurde ein aberrantes *WIPF1*-Methylierungsmuster im Gewebe von MC- und CU-Patienten im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgeweben detektiert. Im E TI-Gewebe der MC-Patienten wurde eine signifikant niedrigere Methylierung gegenüber den Kontrollgeweben und gegenüber dem MC TI NE-Gewebe festgestellt. Im E und NE Colon-Gewebe der MC- und CU-Patienten lag ebenfalls eine signifikant niedrigere *WIPF1*-Methylierung als im Colon-Gewebe der



Kontrollen vor. Die Expressionsanalysen ergaben keine signifikanten Unterschiede der *WIPF1*-mRNA Menge in MC- und CU-Patienten im Vergleich mit den Kontrollpersonen.

In der Methylierungsanalyse wurden zwei benachbarte CpGs untersucht, die laut Infinium® HumanMethylation450 BeadChip eine regulatorisch wichtige Funktion haben. Da die festgestellten signifikanten Veränderungen in der *WIPF1* Methylierung keine sichtbaren Auswirkungen auf die Genexpression zu haben scheinen, ist hier davon auszugehen, dass die Region (-71 bp vor dem Transkriptionsstart) mit den untersuchten CpGs keine regulatorisch wichtige Aufgabe bezüglich der Genexpression im Ileum und Colon hat oder andere regulatorische Mechanismen wie z.B. Histonmodifikationen die Auswirkung der Methylierungsveränderungen auf die Genexpression abschwächen oder überlagern.

#### **4.5.2 BTB and CNC Homology 1 basic leucine zipper transcription factor 2 (BACH2)**

Das *BACH2*-Gen kodiert für einen transkriptionalen Repressor, der zu der Familie der basic Leucin Zipper (bZIP) gehört, und ist auf Chromosom 6q15 lokalisiert (Oyake et al. 1996). *BACH2* spielt sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität eine wichtige Rolle. Aufgrund des Umstandes, dass *BACH2* durch E2A, FOXO1 und PAX5 aktiviert wird, wird angenommen, dass *BACH2* an der frühen B-Zell-Entwicklung beteiligt ist (Tsukumo et al. 2013). Mutationen im *BACH2*-Gen sind im Zusammenhang mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Typ 1-Diabetes (Winkler et al. 2014), rheumatische Arthritis (McAllister et al. 2013) und Multiple Sklerose (Perga et al. 2015) beschrieben. Im Jahr 2010 wurde zum ersten Mal eine mit MC assoziierte Mutation im *BACH2*-Gen (rs1847472) beschrieben (Franke et al. 2010a). Eine weitere Mutation wurde in zwei pädiatrischen CU-Patienten mit einer sehr frühen Manifestation identifiziert (Christodoulou et al. 2013).

In der vorliegenden Studie wurden signifikante Methylierungsunterschiede in einer putativ regulatorisch wichtigen Region des *BACH2*-Gens im Colon-Gewebe von MC- und CU-Patienten festgestellt. Die Methylierung war sowohl in den MC- und CU-Colon NE-Proben als auch in den MC- und CU-Colon E-Proben im Vergleich

mit den Kontrollproben signifikant erniedrigt. Davon ausgehend, dass eine erniedrigte Methylierung in der Promoter- oder anderweitig regulatorisch wichtigen Region zu einer Aktivierung der Gen-Expression führt, wäre eine erhöhte *BACH2* mRNA-Menge in den MC- und CU Colon-Proben zu erwarten gewesen. Die Analysen zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der *BACH2*-Expression in MC- und CU-Patienten gegenüber den Kontrollpersonen.

Ausgehend von diesen Ergebnissen, scheint es, als ob die mittels Pyrosequenzierung untersuchte Region keine ausschlaggebende Funktion für die Regulation der *BACH2* Genexpression im Colon hat. Um sicher zu stellen, dass die geringe Probenanzahl und die hohe Heterogenität der Proben nicht zu falsch negativen Ergebnissen geführt hat, sollten das Probenkollektiv vergrößert werden und weitere Analysen durchgeführt werden.

#### **4.6 Gene mit aberranter Methylierung und Genexpression in MC-und CU-Patienten**

##### **4.6.1 Interleukin 17 receptor E-like (*IL17REL*)**

Das *IL17REL*-Protein gehört zu einer Untergruppe der IL17-Rezeptoren, die erst vor einigen Jahren identifiziert wurden (Wu et al. 2011) und über deren Funktion aktuell nur sehr wenig bekannt ist. Das *IL17REL*-Gen auf Chromosom 22 q13.33 ist in verschiedenen Spezies zum Teil hoch konserviert. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Interleukin 17-Rezeptor E, *IL17RE*, wird angenommen, dass beide Rezeptoren auch ähnliche Funktionen haben. *IL17RE* ist ein funktioneller Rezeptor, der zusammen mit *IL17RA* einen Komplex bildet, an den *IL17C* spezifisch bindet (Song et al. 2011). *IL17C* aktiviert nachgeschaltete Prozesse, die wiederum zur Aktivierung von Genen führen, die für antibakterielle Moleküle kodieren. *Il17re*-Knockout-Mäuse zeigten eine hohe Sensibilität gegenüber bakteriellen Infektionen im Vergleich mit WT-Mäusen, was auf eine wichtige Rolle des *IL17C*-*IL17RE*-Signalwegs in der Immunantwort auf intestinale Pathogene hinweist.

In einer genomweiten Assoziationsstudie konnte eine Missense-Mutation (p.Leu333Pro) im *IL17REL*-Gen (rs5771069) mit CU assoziiert werden (Franke et al. 2010b). Die Autoren vermuten, dass durch den Aminosäureaustausch von

Leucin zu Prolin an Position 333 die Proteinstruktur beeinflusst und dadurch entweder die Rezeptor-Komplex Bildung oder die Ligandenbindung beeinträchtigt wird. Die Assoziation dieses SNPs mit CU wurde in einer weiteren Studie bestätigt (Anderson et al. 2011).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden signifikante Veränderungen im Methylierungsmuster der putativen Promoterregion des *IL17REL*-Gens im Colon von MC- und CU-Patienten identifiziert. Es konnte eine höhere Methylierung sowohl in den E- als auch in den NE Colon-Proben der MC- und CU-Patienten im Vergleich mit den Kontrollen festgestellt werden. Im TI der MC-Patienten zeigten sich keine Veränderungen in der Promotermethylierung. Die Untersuchung des Expressionsmusters der gleichen Proben ergab lediglich eine signifikant niedrigere *IL17REL*-Expression der E- und NE MC Colon-Proben im Vergleich mit den Colon Kontrollen. Sowohl im TI-Gewebe von MC-Patienten als auch im Colon-Gewebe von CU-Patienten war keine veränderte *IL17REL*-Expression im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen festzustellen.

Die beschriebenen Ergebnisse der Analysen der Colon-Gewebeproben von MC-Patienten zeigen zunächst die Korrelation zwischen DNA-Methylierung und Genexpression. Der Anstieg der Methylierung geht hier einher mit einer verringerten Genexpression. Diese Korrelation bestärkt die Theorie, dass die untersuchte putative Promoterregion tatsächlich eine regulatorische Funktion hat. Zur Verifizierung müssen allerdings auch die Ergebnisse der Luciferase-Assays für die putative Promoterregion berücksichtigt werden (Kapitel 5.6).

Da über die Funktion von *IL17REL* fast nichts bekannt ist, ist es schwierig, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit einen Rückschluss auf die Auswirkungen der veränderte Genexpression bzw. auf die allgemeine Rolle von *IL17REL* in der Pathogenese von CED zu ziehen.

#### **4.6.2 Mucin 2 (*MUC2*)**

Das *MUC2*-Gen gehört ebenso wie das *MUC15*-Gen zu der Familie der Mucin-Gene und ist auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert. *MUC2* ist ein von Goblet-Zellen produziertes sekretorisches Mucin und in gesunden Individuen das am häufigsten vertretene Mucin in der Mukosa (Senapati et al. 2011). Im Allgemeinen ist

während einer akuten Entzündungsphase die Anzahl der Goblet-Zellen erhöht, was mit einer gesteigerten Mucin-Produktion einhergeht (Boltin et al. 2013).

Die Rolle der Mucine und im Besonderen von MUC2 in CED wurde aus verschiedenen Blickwinkeln in zahlreichen Studien untersucht. Die Bedeutung der Mucine in der Pathogenese von CED ist unumstritten. *Muc2*-defiziente (*muc2*<sup>-/-</sup>) Mäuse entwickeln eine spontane Colitis, die im Erscheinungsbild und involvierten Immunzellen dem Krankheitsbild in CU-Patienten sehr ähnlich ist (Wenzel et al. 2014).

Eine der ersten Studien in diesem Bereich identifizierten einen Anstieg des MUC2-Proteins in MC Colon E-Proben im Vergleich mit gesunden Kontrollproben. Dieser Unterschied war in während einer Remissionsphase entnommenen Proben nicht mehr feststellbar. Ebenso wurde kein *MUC2*-Expressionsunterschied auf mRNA-Ebene in MC-Patienten gegenüber den Kontrollpersonen detektiert (Tytgat et al. 1996). Spätere cDNA-Microarray-Analysen haben gezeigt, dass die *MUC2*-Genexpression im NE Colon-Gewebe von MC-Patienten signifikant niedriger ist als in gesundem Colon-Gewebe von Kontrollen (Moehle et al. 2006). In der gleichen Studie konnte auch eine Mutation im *MUC2*-Gen mit MC aber nicht mit CU assoziiert werden. *MUC2*-Methylierungsunterschiede in MC- oder CU-Patienten sind aktuell noch nicht beschrieben.

Die Ergebnisse der Methylierungs- und Expressionsanalysen in der vorliegenden Studie zeigen lediglich Unterschiede in Colon-Gewebe von CU-Patienten im Vergleich zu den Colon-Kontrollproben. Die Auswertung des Gesamtkollektivs ergab eine signifikant höhere *MUC2*-Methylierung in den CU Colon E-Proben gegenüber den Kontrollproben, deren Signifikanz leider im Teilkollektiv nicht bestätigt werden konnte. Davon ausgehend, dass eine erhöhte Methylierung zu einer verminderten Genexpression führt, wäre hier eine geringere *MUC2*-mRNA-Expression in Colon-Proben von CU-Patienten im Vergleich mit den Colon-Kontrollproben zu erwarten gewesen. Die CU Colon E-Proben zeigten allerdings gegenüber den Kontrollen einen Anstieg der *MUC2*-Expression. Auf den ersten Blick ist hier keine Korrelation zwischen Methylierung und Expression zu erkennen. Ausgehend von diesen Ergebnissen scheint es, dass die mittels Pyrosequenzierung untersuchte Promoter-Region keine Relevanz für die Regulation der *MUC2*-Genexpression hat. Möglich wäre auch, dass andere regulatorische Mechanismen, wie z.B. durch die Entzündungsreaktion

hervorgerufene Histonmodifikationen, zusätzliche Auswirkungen auf die *MUC2*-Genexpression haben. Um die Ergebnisse dieser Studie verifizieren zu können, müssten weitere Analysen an einem vor allem in Bezug auf entzündliche Proben erweiterten Kollektiv durchgeführt werden.

#### 4.6.3 Mucin 6 (MUC6)

Das MUC6-Protein gehört ebenfalls zur Familie der Mucine und ist ein sekretorisches Glykoprotein, das eine essentielle Rolle bei der vor Schadstoffen wie Säuren und Proteasen sowie vor Pathogenen schützenden Barrierefunktion des Gastrointestinaltrakts spielt (Toribara et al. 1993). Das *MUC6*-Gen ist in direkter Nachbarschaft zum *MUC2*-Gen auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert. In gesunden Individuen wird MUC6 hauptsächlich im Drüsenepithel verschiedener Organe, vor allem aber im Magen exprimiert (Bartman et al. 1998).

Ähnlich wie für *MUC2* ist der Zusammenhang mit CED und Veränderungen der *MUC6*-Expression in der Vergangenheit vielfach beschrieben und diskutiert worden. In mehrere Studien konnte durch Immunhistochemische Analysen gezeigt werden, dass in gesundem Ileum- oder Colon-Gewebe und nicht-entzündlichem CED-Gewebe MUC6 nicht oder nur minimal exprimiert wird, in entzündlichem Gewebe von CED-Patienten hingegen schon (Toribara et al. 1993; Bartman et al. 1998; Buisine et al. 1999; Buisine et al. 2001; Moehle et al. 2006). Genauere Analysen zeigten, dass die Veränderungen der MUC6-Expression vor allem mit dem Vorhandensein von Neoplasien in CU (Borralho et al. 2007) und Ulzerationen in MC (Buisine et al. 2001) assoziiert sind. Studien zur *MUC6*-Methylierung in CED-Gewebe oder Blut wurden bisher noch nicht veröffentlicht.

In der vorliegenden Studie wurden signifikante Veränderungen im Methylierungsmuster der putativen Promoterregion des *MUC6*-Gens im Colon von MC- und CU-Patienten identifiziert. Es konnte eine höhere Methylierung sowohl in den E- als auch in den NE Colon-Proben der MC- und CU-Patienten gegenüber den Colon-Kontrollproben festgestellt werden. Im TI der MC-Patienten zeigten sich keine Veränderungen in der Promotermethylierung. Die Untersuchung des Expressionsmusters der gleichen Proben ergab lediglich eine signifikant niedrigere *MUC6*-Expression der MC Colon NE-Proben im Vergleich mit den Colon-

Kontrollproben. Sowohl im TI-Gewebe von MC-Patienten als auch im Colon-Gewebe von CU-Patienten war keine veränderte *MUC6*-Expression festzustellen. Basierend auf den Ergebnissen der Methylierungsanalyse wäre eine Abnahme der *MUC6*-Expression mit zunehmender Entzündung zu erwarten gewesen. Die MC Colon E-Proben zeigten jedoch eine ähnliche *MUC6*-Expression wie die Colon-Kontrollproben. Es scheint, dass die Methylierungsveränderungen generell zwar mit der Expression korrelieren, allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. So könnten Prozesse, die durch die Entzündungsreaktion ausgelöst werden, ebenfalls eine Veränderung der Expression herbeiführen und die Auswirkungen des Methylierungsanstiegs außer Kraft setzen oder überlagern.

Generell konnten in der hier vorliegenden Arbeit die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die einen Anstieg der *MUC6*-Expression in CED Patienten nachweisen konnten, nicht bestätigt werden. Da in einigen dieser Studien die *MUC6*-Expression auf Proteinebene nachgewiesen wurde, wäre es für einen optimalen Vergleich wichtig, immunhistochemische Analysen der *MUC6*-Expression an noch verfügbaren Gewebeproben unseres Kollektivs durchzuführen.

#### **4.6.4 Signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4)**

Das *STAT4*-Gen ist auf Chromosom 2q32.3 lokalisiert und kodiert wie auch *STAT3* für ein Mitglied der STAT-Protein-Familie. *STAT4* ist als Transkriptionsfaktor in die durch IL-12, IL-23 und Typ 1 Interferon vermittelten Signalkaskaden involviert (Korman et al. 2008). Des Weiteren trägt *STAT4* zur Differenzierung von T-Helferzellen vom Typ Th1- und Typ Th17 sowie zur Aktivierung von Monozyten bei. Durch Studien an Knockout- und transgenen Mäusen konnte die essentielle Rolle von *STAT4* bei der Immunantwort in entzündlichen Erkrankungen belegt werden (Kaplan 2005). Der Bedarf der *STAT4*-abhängigen Regulation von Zytokinen unterstreicht die Wichtigkeit von *STAT4* bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie Lupus erythematodes, rheumatischer Arthritis und CED (Finnegan et al. 2002; Jacob et al. 2003).

Die Verbindung zwischen Veränderungen im *STAT4*-Gen und CED ist in der Vergangenheit mehrfach beschrieben und diskutiert worden. Mutationen im

*STAT4*-Gen wurden in verschiedenen Studien sowohl mit MC als auch mit CU assoziiert (Glas et al. 2010; Moon et al. 2010; Zhu et al. 2013; Xu et al. 2014).

In einer ausführlichen Studie wurden die Veränderungen der *STAT4*-Methylierung und -Expression im Colon-Gewebe von MC- und CU-Patienten untersucht und die Ergebnisse mit den *STAT4*-Genotypen der Patienten korreliert (Kim et al. 2012). Die Analysen des gesamten *STAT4*-Promoters zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den CED-Patienten und den Kontrollpersonen. In einem Teilbereich des Promoters konnte jedoch eine Hypomethylierung in CED-Patienten festgestellt werden. Die *STAT4*-Expression in diesen CED-Patienten war signifikant höher im Vergleich mit den Kontrollpersonen. In einer pädiatrischen Studie konnte ebenfalls eine erhöhte *STAT4*-Genexpression in entzündlichem Colon-Gewebe von CU-Patienten nachgewiesen werden (Ohtani et al. 2010). Nach heutigem Wissenstand wurde noch keine Methylierungs- oder Expressionsstudie an TI-Gewebe von MC-Patienten durchgeführt.

In der hier vorliegenden Studie wurde sowohl im TI von MC-Patienten als auch im Colon von MC- und CU-Patienten im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollpersonen eine geringere *STAT4*-Methylierung detektiert. Die Expressionsanalyse desselben Kollektivs ergab unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen Gewebearten. Die *STAT4*-Expression war in den MC TI NE Proben signifikant höher als in den TI-Kontrollproben. In diesem Fall scheint die verminderte Methylierung mit der erhöhten Expression zu korrelieren. Da allerdings die Methylierung mit zunehmender Entzündung weiter sank, wäre ebenfalls ein Anstieg der Expression in den MC TI E-Proben zu erwarten gewesen. Abweichende Ergebnisse zeigte die Analyse der NE Colon-Proben der MC- und CU-Patienten. Hier wurde eine verminderte Expression gegenüber den Kontrollproben detektiert. Diese Beobachtungen korrelieren nicht mit den erhöhten *STAT4*-Expressionswerten, die in zwei Studien im Colon-Gewebe von MC- und CU-Patienten gemessen wurden (Ohtani et al. 2010; Kim et al. 2012). Ein Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnte zum einen sein, dass in den zitierten Studien andere Areale des Colons untersucht wurden und je nach Lokalisation Abweichungen in der *STAT4*-Expression vorliegen. Zum Anderen wurden in einer Studie (Ohtani et al. 2010) Kinder untersucht, in deren Gewebe andere *STAT4*-Expressionsmuster als im Gewebe von erwachsenen MC- und CU-Patienten vorliegen könnten.

Um valide Ergebnisse zu erhalten, sollte das Probenkollektiv, vor allem die Gruppe der MC Colon E- und CU Colon E-Proben deutlich vergrößert werden und neue Messungen durchgeführt werden.

#### **4.7 Allgemeine Schlussfolgerungen und zukünftige Strategien zur Expressions- und Methylierungsanalyse**

Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse der Methylierungs- und Expressionsanalysen für einige Gene einen Zusammenhang zwischen aberranter Methylierung und veränderter Genexpression in CED-Patienten im Vergleich mit Kontrollindividuen. Durch die genomweiten Methylierungsanalyse konnte eine große Anzahl an Kandidatengenen identifiziert werden, deren Assoziation mit CU und MC in dieser Studie nur in einem kleinen Maßstab verifiziert werden konnte. Um eine flächendeckende Korrelation zwischen veränderter Methylierung und Genexpression herzustellen, wäre es möglich für die 24 mittels BeadChip analysierten Proben (CU Colon NE, CU Colon E und K Colon), eine genomweite Expressionsanalyse mittels Micro-Arrays oder Next Generation-basierter RNA-Sequenzierung durchzuführen. Dadurch wäre es möglich, die Methylierung und Expression vieler Gene parallel zu untersuchen. Gene bei denen sowohl die Methylierung als auch die Expression in CU-Patienten gegenüber den Kontrollen verändert ist, müssten dann zunächst mit Bisulfit-Pyrosequenzierung und qRT-PCR validiert und anschließend an einem größeren Kollektiv untersucht werden. Neben Anwendung von weiteren Methoden wäre es sinnvoll, das Kollektiv, sowohl um Patienten als auch um Kontrollen zu erweitern und vor allem die Anzahl der entzündlichen Proben zu vergrößern. Zusätzlich wäre es von Vorteil, Patienten in die Studie aufzunehmen, die verschiedene Krankheitsausprägungen aufweisen, wie z.B. Patienten mit und ohne Dysplasien, extraintestinalen Manifestationen, oder Patienten mit einem besonders schweren Krankheitsverlauf, um eventuelle Veränderungen im Gewebe mit unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheit zu assoziieren. Im Weiteren wäre es sehr interessant, Patienten über mehrere Jahre zu begleiten und in verschiedenen Krankheitsabschnitten (aktiver Schub und Remissionsphase) Biopsien zu entnehmen um Patienten-spezifische Methylierungsunterschiede identifizieren zu können.



#### 4.8 Funktionelle Charakterisierung der putativen *IL17REL*-Promoterregion

*IL17REL* zeigte wie schon weiter oben beschrieben aberrante Methylierungs- und Expressionsmuster in CED-Patienten gegenüber den Kontrollindividuen. Da sowohl über die Funktion von *IL17REL* als auch über die Promoterregion kaum bzw. gar keine Informationen vorlagen, wurden zusätzlich funktionelle Analysen des putativen Promoterbereichs mittels Dual-Luciferase-Assay durchgeführt. Die drei untersuchten in einen pGL4.10-Vektor klonierten *IL17REL*-Promoter-Abschnitte (C1: 789 bp -806 - -8; C2: 587 bp -806 - -219 und C3: 361 bp -806 - -445), kloniert, zeigten nach der Transfektion in HCT116-Zellen unterschiedliche Aktivitäten. Die relative Luciferase-Aktivität war signifikant höher im C1-Konstrukt, mit den in der Methylierungsanalyse untersuchten CpGs im Vergleich zu den kürzeren C2- und C3-Konstrukten, in denen die in der Methylierungsanalyse untersuchten CpGs nicht enthalten waren. Das C2-Konstrukt wiederum zeigte eine signifikant höhere Luciferase-Aktivität als das C3-Konstrukt.

Die Ergebnisse der Promoteranalyse geben Rückschlüsse auf die Aktivität putativ regulatorischer Regionen, in diesem Fall auf die des *IL17REL* Promoters. Die mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung untersuchte Region (C1-Konstrukt) zeigte die höchste aktivierende Eigenschaft. Dies lässt den Schluss zu, dass dieser Bereich relevant für die transkriptionelle Aktivierung des Gens ist und Methylierungsveränderungen in diesem Bereich Auswirkungen auf die Genexpression haben. Es konnte somit zum ersten Mal ein bestimmter Teil des *IL17REL*-Promoters (-800 bis -8 vor dem Transkriptionsstart) genauer charakterisiert werden und in funktionelle und nicht-funktionelle Bereiche unterteilt werden.

Ergänzend wäre es sinnvoll noch weitere Bereiche des *IL17REL*-Promoters zu untersuchen, um eine flächendeckendere Charakterisierung zu gewährleisten. Auch die Verwendung anderer Zelllinien könnten weitere Informationen liefern. Es konnte zwar eine *IL17REL*-Expression in HCT116-Zellen nachgewiesen werden; allerdings bietet diese Zelllinie in Bezug auf CED nicht die optimale zelluläre Umgebung. Es wäre möglich, ein Zellmodell zu verwenden, in dem ein entzündlicher Prozess, z.B. durch die Zugabe von Lipopolysacchariden (LPS) zu einer Colon-Ca Zelllinie, ausgelöst wird (Ogle et al. 1997). Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung eines speziell für die CED-Forschung

entwickelten Kokultur-Modells, bei dem humane kolorektale Adenokarzinom Zellen (CaCo2-Zellen) auf einer Collagenschicht kultiviert werden, in der aus peripheren Blutlymphozyten isolierte Makrophagen und dendritische Zellen, eingebettet sind (Leonard et al. 2010). In dieser Kokultur werden ähnlich einer Entzündung im Darm, proinflammatorische Marker aktiviert und bestimmte Zytokine produziert.

#### **4.9 Aktueller Stand und Zukunftsperspektiven bezüglich klinischer Implikationen und Therapien**

Langfristiges Ziel dieser und auch anderer Studien ist es, Biomarker in Form von epigenetischen Veränderungen einzelner Gene zu etablieren. Diese Biomarker könnten helfen, die Diagnose einer CED zu sichern, mögliche Krankheitsverläufe besser zu prognostizieren und eine eventuelle Tumorentwicklung vorherzusagen. Darüber hinaus wäre es in schwierigen Fällen möglich, durch die Spezifität bestimmte Biomarker für entweder MC oder CU zwischen den beiden Erkrankungen zu unterscheiden.

In den letzten Jahren lag der Fokus der Etablierung von Biomarkern für CED hauptsächlich auf der Früherkennung und Verlaufsprognose eines möglichen Kolonkarzinoms in CED-Patienten. Dysplasien sind aktuell der beste Indikator für eine Risikoeinschätzung in Bezug auf eine eventuelle Krebserkrankung, da in 75 % bis 90 % aller CED-Patienten mit Kolonkarzinom eine Dysplasie vorliegt (Papadia et al. 2014). Auf der anderen Seite entwickeln nicht alle Patienten mit einer geringgradigen Dysplasie eine schwere Dysplasie oder Krebs. Die Einstufung der Dysplasien und Risikoeinschätzung unterliegen demnach Schwankungen, abhängig von der Sensibilität der durchgeführten Koloskopie und der Beurteilung durch die behandelnden Ärzte. Zusätzliche aussagekräftige Biomarker, die auf Dysplasien hindeuten, wären für das Management der Risikoeinschätzung sehr wertvoll. Verschiedene vielversprechende Biomarker wurden bereits identifiziert. So konnte eine Hypermethylierung von *FOXE1* und *SYNE1* in 60 % bzw. 80 % der Patienten mit CU-assoziiertem Kolonkarzinom, jedoch nicht in gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Papadia et al. 2014). Eine Möglichkeit der nicht-invasiven Identifikation von CU-assoziierten Kolonkarzinomen wurde 2013 veröffentlicht (Kisiel et al. 2013). In Stuhlproben von CED-Patienten mit bzw. ohne Kolonkarzinom war es möglich, durch Bestimmung des Methylierungsstatus von *BMP3* 100 % aller Kolonkarzinome und 84 % aller

Neoplasmen mit einer Spezifität von 91 % zu detektieren. Eine Kombination von zwei Genen (*BMP3* und *NDRG4*) ermöglicht die Identifizierung aller Kolonkarzinome und hochgradiger Dysplasien (100%) und 67 % der geringgradigen Dysplasien. Um Anwendung in der klinischen Diagnostik von CED zu finden, müssten Sensibilität und Spezifität der einzelner Biomarker an größeren Patientenkollektiven bestätigt werden.

In den letzten Jahren wurden einige Gene identifiziert, die aberrante Methylierungsmuster in MC- oder CU-Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen zeigten (Tahara et al. 2009; Arasaradnam et al. 2010; Saito et al. 2011; Lin et al. 2011; Cooke et al. 2012). Eine Studie an Gewebe- oder Stuhlproben mit einem entsprechend großen Patientenkollektiv zur Testung der Eignung dieser Gene als Biomarker wurde allerdings aktuell noch nicht veröffentlicht. Durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Studie konnten neue Gene identifiziert werden die potenzielle Biomarker für die initiale Diagnose von CED und Diskriminierung zwischen MC und CU darstellen.

Im Allgemeinen ist die Anwendung von epigenetischen Biomarkern in der klinischen Diagnostik von CED ein zukunftssträchtiges Konzept. Allerdings werden, bedingt durch die Heterogenität der verschiedenen Patienten, vermutlich nicht einzelne Biomarker zum Einsatz kommen. Es ist vielmehr notwendig, ein Biomarkerprofil für verschiedene Krankheitsausprägungen zu etablieren.

Auch im Hinblick auf mögliche Therapieansätze zur Behandlung von CED wird die Untersuchung epigenetischer Faktoren in Zukunft einen noch höheren Stellenwert einnehmen. Das Präparate, die die DNA-Methylierung beeinflussen, Potential zur Therapie von CED haben, konnte zunächst am Beispiel der Folsäure gezeigt werden. Folsäure ist ein Methylgruppen-Donor, der essentiell für die Entwicklung in Säugern ist und im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen beschrieben wurde (Crider et al. 2012). Klinische Studien haben gezeigt, dass in CED-Patienten häufig ein Folsäure-Mangel vorliegt (Erzin et al. 2008; Yakut et al. 2010). In einer Mausstudie, in der durch Dextransulfat (DSS) eine Colitis ausgelöst wurde, konnte darüber hinaus eine Reduktion der Schwere der Colitis durch Gabe von Folsäure erzielt werden (Kominsky et al. 2012).

Substanzen wie z.B. Histon-Deacetylasen (HDAC)- oder DNMT-Inhibitoren, die epigenetische Prozesse beeinflussen, bieten ebenfalls neue therapeutische Möglichkeiten in der Behandlung von CED. Die Wirkung von DNMT-Inhibitoren auf

CED wurde noch nicht getestet. HDACs sind Enzyme, die spezifisch Acetylgruppen von in Histonen oder anderen Proteinen befindlichen Lysin abspalten (Choudhary et al. 2009). Unterschiedliche Versuchsansätze mit verschiedenen global wirkenden HDAC-Inhibitoren in DSS und Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Mausmodellen zeigten eine Reduktion von Entzündung und Begleitsymptomen der Colitis, wie z.B. Gewichtsverlust und Darmverkürzung (Felice et al. 2015). Die positiven Ergebnisse im Bezug auf den Krankheitsverlauf in Mäusen zeigen das Potential der HDAC-Inhibitoren in der CED-Therapie und lassen auf ähnliche Wirkungsweisen in CED-Patienten hoffen. Ideal wäre die Entwicklung von HDAC-Inhibitoren, die einen spezifischen Effekt auf die im intestinalen Entzündungsprozess involvierten Enzyme haben.

## 5. Literaturverzeichnis

- Abdollahpour, H. et al., 2012. The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood*, 119(15), pp.3450–3458.
- Allchin, W., 1909. Ulcerative Colitis. *Proc R Soc Med*, 2, pp.59–75.
- Anderson, C.A. et al., 2011. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics*, 43(3), pp.246–52.
- Antón, I.M. et al., 2002. WIP Deficiency Reveals a Differential Role for WIP and the Actin Cytoskeleton in T and B Cell Activation. *Immunity*, 16, pp.193–204.
- Antoni, L. et al., 2014. Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*, 20(5), pp.1165–79.
- Arasaradnam, R.P. et al., 2010. DNA methylation of ESR-1 and N-33 in colorectal mucosa of patients with ulcerative colitis (UC). *Epigenetics*, 5(5), pp.422–426.
- Ardizzone, S. et al., 2008. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Digestive and liver disease*, 40(2), pp.253–259.
- Atreya, R. et al., 2010. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine*, 6(5), pp.583–588.
- Azarschab, P. et al., 2002. Epigenetic control of the E-cadherin gene (CDH1) by CpG methylation in colectomy samples of patients with ulcerative colitis. *Genes, chromosomes & cancer*, 35, pp.121–126.
- Baek, S.H., 2011. When signaling kinases meet histones and histone modifiers in the nucleus. *Molecular cell*, 42(3), pp.274–284.
- Balasa, A. et al., 2010. Assessment of DNA methylation at the interferon regulatory factor 5 (IRF5) promoter region in inflammatory bowel diseases. *International journal of colorectal disease*, 25, pp.553–556.
- Ballestar, E. & Wolffe, A.P., 2001. Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *European journal of biochemistry*, 268, pp.1–6.
- Bannister, A.J. & Kouzarides, T., 2005. Reversing histone methylation. *Nature*, 436(7054), pp.1103–6.
- Barr, M. & Bertram, E., 1949. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 163, pp.41–48.
- Barreiro, O. & Sánchez-Madrid, F., 2009. Molecular Basis of Leukocyte – Endothelium Interactions During the Inflammatory Response. *Rev Esp Cardiol.*, 62(5), pp.552–562.

- Bartman, A. et al., 1998. The MUC6 secretory mucin gene is expressed in a wide variety of epithelial tissue. *Journal of Pathology*, 186, pp.398–405.
- Baumgart, D.C. & Dignass, A.U., 2002. Intestinal barrier function. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 5(6), pp.685–94.
- Bernstein, C.N. et al., 2001. The Prevalence of Extraintestinal Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. *The American journal of gastroenterology*, 96(4), pp.1116–1122.
- Best, R., Singleton, J.W. & Crohn, B.B., 1976. Development of a Crohn's disease activity Index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*, 70(3), pp.439–444.
- Bestor, T.H., 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9(16), pp.2395–2402.
- De Boer, N.K.H. et al., 2007. Drug Insight: pharmacology and toxicity of thiopurine therapy in patients with IBD. *Gastroenterology & hepatology*, 4(12), pp.686–94.
- Boltin, D. et al., 2013. Mucin function in inflammatory bowel disease: an update. *Journal of clinical gastroenterology*, 47(2), pp.106–111.
- Bonen, D.K. & Cho, J.H., 2003. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 124(2), pp.521–536.
- Bonnet, J., Devys, D. & Tora, L., 2014. Histone H2B ubiquitination: signaling not scrapping. *Epigenetics*, 12, pp.e19–27.
- Borralho, P. et al., 2007. Aberrant gastric apomucin expression in ulcerative colitis and associated neoplasia. *Journal of Crohn's & colitis*, 1, pp.35–40.
- Buisine, M. et al., 2001. Mucin gene expression in intestinal epithelial cells in Crohn ' s disease. *Gut*, 49, pp.544–551.
- Buisine, M.-P. et al., 1999. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 5(1), pp.24–32.
- Calkins, B.M., 1989. A Meta-Analysis of the Role of Smoking in Inflammatory Bowel Disease. *Digestive diseases and sciences*, 34(12), pp.1841–1854.
- Canavan, C., Abrams, K.R. & Mayberry, J., 2006. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23(8), pp.1097–104.
- Carthew, R.W. & Sontheimer, E.J., 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), pp.642–655.
- Cheng, J. et al., 2014. A role for H3K4 monomethylation in gene repression and partitioning of chromatin readers. *Molecular cell*, 53(6), pp.979–92.
- Cheung, W.L. et al., 2003. Apoptotic Phosphorylation of Histone H2B Is Mediated by Mammalian Sterile Twenty Kinase. *Cell*, 113, pp.507–517.

- Choudhary, C. et al., 2009. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science*, 325, pp.834–841.
- Chouraki, V. et al., 2011. The changing pattern of Crohn's disease incidence in northern France: a continuing increase in the 10- to 19-year-old age bracket (1988-2007). *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 33(10), pp.1133–42.
- Christodoulou, K. et al., 2013. Next generation exome sequencing of paediatric inflammatory bowel disease patients identifies rare and novel variants in candidate genes. *Gut*, 62(7), pp.977–984.
- Citalán-Madrid, A.F. et al., 2013. Small GTPases of the Ras superfamily regulate intestinal epithelial homeostasis and barrier function via common and unique mechanisms. *Tissue Barrier*, 1(5), p.e26938.
- Cobrin, G.M. & Abreu, M.T., 2005. Defects in mucosal immunity leading to Crohn ' s disease. *Immological review*, 206, pp.277–295.
- Cooke, J. et al., 2012. Mucosal genome-wide methylation changes in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 18(11), pp.2128–2137.
- Cosnes, J., 2004. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best practice & research. Clinical gastroenterology*, 18(3), pp.481–496.
- Creasy, C.L. & Chernoff, J., 1995. Cloning and Characterization of a Human Protein Kinase with Homology to Ste20\*. *The journal of Biological Chemistry*, 270(37), pp.21695–21700.
- Crider, K.S. et al., 2012. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate ' s Role 1 , 2. *Advanced Nutrition*, 3, pp.21–38.
- Crohn, B.B., Ginzburg, L. & Oppenheimer, G.D., 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA*, 99, pp.1323–1329.
- Curcio, C. et al., 2007. WIP null mice display a progressive immunological disorder that resembles Wiskott – Aldrich syndrome. *Journal of Pathology*, 211, pp.67–75.
- D'Anna, J.A. & Isenberg, I., 1974. A Histone Cross-Complexing Pattern. *Biochemistry*, 13(24), pp.4992–4997.
- D'Haens, G. & Ochsenkühn, T., 2011. Current misunderstandings in the management of ulcerative colitis. *Gut*, 60(9), pp.1294–1299.
- DeRoche, T.C., Xiao, S.-Y. & Liu, X., 2014. Histological evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterology report*, 2(3), pp.178–192.
- Dhe-Paganon, S., Syeda, F. & Park, L., 2011. Review Article DNA methyl transferase 1 : regulatory mechanisms and implications in health and disease. *Int J Biochem Mol Biol*, 2(1), pp.58–66.
- Ek, W.E., Amato, M.D. & Halfvarson, J., 2014. The history of genetics in infl ammatory bowel disease. , pp.294–303.

- Erzin, Y. et al., 2008. Hyperhomocysteinemia in Inflammatory Bowel Disease Patients Without Past Intestinal Resections. *Journal of clinical gastroenterology*, 42(5), pp.481–486.
- Farhi, D. et al., 2008. Significance of erythema nodosum and pyoderma gangrenosum in inflammatory bowel diseases: a cohort study of 2402 patients. *Medicine*, 87(5), pp.281–293.
- Feagins, L.A. et al., 2011. Current strategies in the management of intra-abdominal abscesses in Crohn's disease. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 9(10), pp.842–850.
- Feinberg, A.P. & Tycko, B., 2004. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews. Cancer*, 4, pp.143–153.
- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., 1983. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancer. *Biochemical and Biophysical research communications*, 111(1), pp.47–54.
- Felice, C. et al., 2015. Review article: selective histone deacetylase isoforms as potential therapeutic targets in inflammatory bowel diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 41(1), pp.26–38.
- Finnegan, A. et al., 2002. IL-4 and IL-12 Regulate Proteoglycan-Induced Arthritis Through Stat-Dependent Mechanisms. *The Journal of Immunology*, 169(6), pp.3345–3352.
- Fire, A. et al., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, pp.806–811.
- Frank, J.D. & Shorey, B.A., 1973. Adenocarcinoma of the small bowel as a complication of Crohn's disease. *Gut*, 14, pp.120–124.
- Franke, A., Balschun, T., et al., 2010. Genome-wide association study for ulcerative colitis identifies risk loci at 7q22 and 22q13 (IL17REL). *Nature genetics*, 42(4), pp.292–294.
- Franke, A., McGovern, D.P.B., et al., 2010. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature genetics*, 42(12), pp.1118–1125.
- Freeman, H.J., 2007. Granuloma-positive Crohn's disease. *Can J Gastroenterol*, 21(9), pp.583–587.
- Frommer, M. et al., 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, pp.1827–1831.
- Glas, J. et al., 2010. Evidence for STAT4 as a common autoimmune gene: rs7574865 is associated with colonic Crohn's disease and early disease onset. *PloS one*, 5(4), p.e10373.
- Gloria, L. et al., 1996. DNA Hypomethylation and Proliferative Activity Are Increased in the Rectal Mucosa of Patients with Long-standing Ulcerative Colitis. *American Cancer Society*, 78(1), pp.2300–2306.



- Gonsky, R., Deem, R.L. & Targan, S.R., 2009. Distinct Methylation of IFNG in the Gut. *Journal of interferon & cytokine research*, 29(7), pp.407–414.
- Gunesh, S. et al., 2008. The incidence of Crohn's disease in Cardiff over the last 75 years: an update for 1996-2005. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 27(3), pp.211–219.
- Harris, R.A. et al., 2014. DNA methylation-associated colonic mucosal immune and defense responses in treatment- naïve pediatric ulcerative colitis. *Epigenetics*, 9(8), pp.1131–1137.
- Hassa, P.O. et al., 2006. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 70(3), pp.789–829.
- Van Heel, D. et al., 2005. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2 - associated Crohn's disease. *The Lancet*, 365, pp.1794–1796.
- Hsieh, C. et al., 1998. Hypermethylation with Long-standing of the p16INK4a Promoter in Colectomy Specimens of Patients and Extensive Ulcerative Colitis. *Cancer research*, 58, pp.3942–3946.
- Huang, J. et al., 2009. Overexpression of MUC15 activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes the oncogenic potential of human colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 30(8), pp.1452–1458.
- Hugot, J. et al., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, pp.599–603.
- Issa, J.J. et al., 2001. Advances in Brief Accelerated Age-related CpG Island Methylation in Ulcerative Colitis. *Cancer research*, 61, pp.3573–3577.
- Jacob, C.O. et al., 2003. Pivotal Role of Stat4 and Stat6 in the Pathogenesis of the Lupus-Like Disease in the New Zealand Mixed 2328 Mice. *The Journal of Immunology*, 171(3), pp.1564–1571.
- Jostins, L. et al., 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), pp.119–24.
- Kalla, R. et al., 2014. Crohn's disease. *Bmj*, 349, p.g6670.
- Kaplan, M.H., 2005. STAT4: A Critical Regulator of Inflammation In Vivo. *Immunologic Research*, 32(1), pp.231–241.
- Kim, S.W. et al., 2012. Abnormal genetic and epigenetic changes in signal transducer and activator of transcription 4 in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Digestive diseases and sciences*, 57, pp.2600–2607.
- Kisiel, J.B. et al., 2013. Stool DNA testing for the detection of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 37(5), pp.546–554.

- Kominsky, D.J. et al., 2012. An Endogenously Anti-Inflammatory Role for Methylation in Mucosal Inflammation Identified through Metabolite Profiling. *The Journal of Immunologie*, 186(11), pp.6505–6514.
- Korman, B.D. et al., 2008. STAT4: Genetics, Mechanisms, and Implications for Autoimmunity Review for Current Allergy and Asthma Reports. *Curr Allergy Asthma Rep.*, 8(5), pp.398–403.
- Kouzarides, T., 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), pp.693–705.
- Laird, P.W. & Jaenisch, R., 1996. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annual review of genetics*, 30, pp.441–464.
- Langholz, E., 2010. Current trends in inflammatory bowel disease: the natural history. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 3(2), pp.77–86.
- Lanzi, G. et al., 2012. A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *The Journal of experimental medicine*, 209(1), pp.29–34.
- Lapeyre, J.-N. & Becker, F.F., 1979. 5-Methylcytosine content of nuclear DNA during chemical Hepatocarcinogenesis and in carcinomas which result. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 87(3), pp.698–705.
- Lapidus, A., 2006. Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: An epidemiological update. *World Journal of Gastroenterology*, 12(1), pp.75–81.
- Leonard, F., Collnot, E.-M. & Lehr, C.-M., 2010. A Three-Dimensional Coculture of Enterocytes, Monocytes and Dendritic Cells To Model Inflamed Intestinal Mucosa in Vitro. *Molecular pharmaceutics*, 7(6), pp.2103–2119.
- Lin, Z. et al., 2012. Identification of disease-associated DNA methylation in B cells from Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Digestive diseases and sciences*, 57, pp.3145–3153.
- Lin, Z. et al., 2011. Identification of disease-associated DNA methylation in intestinal tissues from patients with inflammatory bowel disease. *Clinical genetics*, 80(1), pp.59–67.
- Loftus, E. V., 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126(6), pp.1504–1517.
- Lovato, P. et al., 2003. Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry*, 278(19), pp.16777–16781.
- Luger, K. et al., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, pp.251–260.
- Luscher, T. et al., 2013. *Magen-Darm-Trakt*,
- Lyon, M., 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature.*, 22(190), pp.372–373.

- Mahid, S.S. et al., 2007. The role of smoking in Crohn's disease as defined by clinical variables. *Digestive diseases and sciences*, 52(11), pp.2897–2903.
- Malone, C.D. & Hannon, G.J., 2009. Small RNAs as Guardians of the Genome. *Cell*, 136(4), pp.656–668.
- Matricon, J., Barnich, N. & Ardid, D., 2010. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self/Nonself*, 1(4), pp.299–309.
- Mayberry, J., 1980. Familial prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. *British Medical Journal*, p.84.
- McAllister, K. et al., 2013. Identification of BACH2 and RAD51B as rheumatoid arthritis susceptibility loci in a meta-analysis of genome-wide data. *Arthritis and rheumatism*, 65(12), pp.3058–3062.
- McCready, Fred J.M.D. , J. Arnold Bargen, M.D. , Malcolm B. Dockerty, M.D. , and John M. Waugh, M., 1949. Involvement of the ileum in chronic ulcerative colitis. *The New England journal of medicine*, 240(4), pp.119–127.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleid Acid Research*, 16(3), p.1215.
- Moehle, C. et al., 2006. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 84(12), pp.1055–1066.
- Molodecky, N. a et al., 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142, pp.46–54.
- Moon, C.M. et al., 2010. Association of signal transducer and activator of transcription 4 genetic variants with extra-intestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *Life sciences*, 86(17-18), pp.661–667.
- Mowat, C. et al., 2011. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 60(5), pp.571–607.
- Mudter, J. et al., 2005. Activation pattern of signal transducers and activators of transcription (STAT) factors in inflammatory bowel diseases. *The American journal of gastroenterology*, 100, pp.64–72.
- Musso, A. et al., 2005. Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Signaling Pathway. *Inflammatory bowel diseases*, 11(2), pp.91–98.
- Nathan, D. et al., 2006. Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes & development*, 20, pp.966–976.
- Nehme, N.T. et al., 2013. MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood*, 119(15), pp.3458–3468.

- Nelson, C.J., Santos-Rosa, H. & Kouzarides, T., 2006. Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell*, 126(5), pp.905–916.
- Neumann, H. et al., 2012. Advanced endoscopic imaging for diagnosis of Crohn's disease. *Gastroenterology research and practice*, 2012, pp.1–8.
- Nikolaus, S. & Schreiber, S., 2007. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 133(5), pp.1670–1689.
- Nimmo, E.R. et al., 2012. Genome-wide Methylation Profiling in Crohn's Disease Identifies Altered Epigenetic Regulation of Key Host Defense Mechanisms Including the Th17 Pathway. *Inflammatory bowel diseases*, 18(5), pp.889–899.
- Ogle, C. et al., 1997. The gut as a source of inflammatory cytokines after stimulation with endotoxin. *Eur J Surg*, 163(1), pp.45–51.
- Ogura, Y. et al., 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, pp.603–606.
- Oh, H.R. et al., 2015. Frameshift Mutations of MUC15 Gene in Gastric and its Regional Heterogeneity in Gastric and Colorectal Cancers. *Pathology oncology research*.
- Ohtani, K. et al., 2010. Increased mucosal expression of GATA-3 and STAT-4 in pediatric ulcerative colitis. *Pediatrics international*, 52, pp.584–589.
- Orchard, T.R., Wordsworth, B.P. & Jewell, D.P., 1998. Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history. *Gut*, 42(3), pp.387–391.
- Ordás, I. et al., 2012. Ulcerative colitis. *Lancet*, 380(9853), pp.1606–1619.
- Orholm, M. et al., 1991. Familial occurrence of Inflammatory Bowel Disease. *The New England journal of medicine*, 324(2), pp.84–88.
- Ott, S.J. et al., 2004. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), pp.685–693.
- Oyake, T. et al., 1996. Bach Proteins Belong to a Novel Family of BTB-Basic Leucine Zipper Transcription Factors That Interact with MafK and Regulate Transcription through the NF-E2 Site. *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), pp.6083–6095.
- Paine, E.R., 2014. Colonoscopic evaluation in ulcerative colitis. *Gastroenterology report*, 2(3), pp.161–8.
- Papadia, C. et al., 2014. FOXE1 and SYNE1 genes hypermethylation panel as promising biomarker in colitis-associated colorectal neoplasia. *Inflammatory bowel diseases*, 20(2), pp.271–277.
- Perga, S. et al., 2015. Anti-inflammatory genes associated with multiple sclerosis: a gene expression study. *Journal of neuroimmunology*, 279, pp.75–78.
- Polińska, B., Matowicka-karna, J. & Kemonia, H., 2011. Assessment of the influence of the inflammatory process on the activation of blood platelets and morphological

- parameters in patients with ulcerative colitis (colitis ulcerosa). *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 49(1), pp.119–124.
- Qin, J. et al., 2013. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), pp.59–65.
- Reenaers, C., Louis, E. & Belaiche, J., 2010. Current directions of biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in gastroenterology*, 3(2), pp.99–106.
- Regueiro, M. et al., 2006. Medical Management of Left-sided Ulcerative Colitis and Ulcerative Proctitis: Critical Evaluation of Therapeutic Trials. *Inflammatory bowel diseases*, 12(10), pp.979–994.
- Reinisch, W. et al., 2005. Infliximab for Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *New england journal of medicine*, 353, pp.2462–2476.
- Renz, H. et al., 2011. Gene-environment interactions in chronic inflammatory disease. *Nature immunology*, 12(4), pp.273–277.
- Robertson, K.D., 2005. DNA methylation and human disease. *Nature genetics*, 6(8), pp.597–610.
- Rojas-Feria, M. et al., 2013. Hepatobiliary manifestations in inflammatory bowel disease: the gut, the drugs and the liver. *World journal of gastroenterology*, 19(42), pp.7327–7340.
- Ronaghi, M., Uhlén, M. & Nyren, P., 1998. DNA Sequencing: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. *Science*, 281(5375), pp.363–365.
- Rutgeerts, P., Vermeire, S. & Van Assche, G., 2009. Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 136(4), pp.1182–97.
- Saito, S. et al., 2011. DNA methylation of colon mucosa in ulcerative colitis patients: correlation with inflammatory status. *Inflammatory bowel diseases*, 17(9), pp.1955–1965.
- Salvarani, C., 2001. Musculoskeletal Manifestations in a Population-based Cohort of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Scand J Gastroenterol*, 12, pp.1307–1313.
- Sandborn, W.J. et al., 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine*, 369(8), pp.711–721.
- Satsangi, J. et al., 2006. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*, 55(6), pp.749–53.
- Scaringi, S. et al., 2013. Colorectal cancer and Crohn's colitis: clinical implications from 313 surgical patients. *World journal of surgery*, 37(4), pp.902–910.
- Senapati, S., Das, S. & Batra, S.K., 2011. Mucin-interacting proteins: from function to therapeutics. *Trends Biochem Sci.*, 35(4), pp.236–245.
- Sharp, A.J. et al., 2011. DNA methylation profiles of human active and inactive X chromosomes. *Genome research*, 21(10), pp.1592–600.

- Shaukat, A. et al., 2011. Crohn's disease and small bowel adenocarcinoma: a population-based case-control study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 20(6), pp.1120–1123.
- Shilatifard, A., 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual review of biochemistry*, 75, pp.243–269.
- Silverberg, M.S. et al., 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 19, pp.5–36.
- Singal, R. & Ginder, G.D., 1999. DNA Methylation. *Blood*, 93(12), pp.4059–4070.
- Singh, P.K. & Hollingsworth, M. a, 2006. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in cell biology*, 16(9), pp.467–476.
- Siomi, M.C. et al., 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(4), pp.246–258.
- Soler, D. et al., 2009. The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti-alpha4beta7 integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 330(3), pp.864–875.
- Song, H. et al., 2010. Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *PNAS*, 107(4), pp.1431–1436.
- Song, X. et al., 2011. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nature immunology*, 12(12), pp.1151–1158.
- Spehlmann, M.E. et al., 2008. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflammatory bowel diseases*, 14(7), pp.968–976.
- Sterner, D.E. & Berger, S.L., 2000. Acetylation of Histones and Transcription-Related Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(2), pp.435–459.
- Sugimoto, K., 2008. Role of STAT3 in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 14(33), pp.5110–5114.
- Tahara, T., et al., 2009. Effect of MDR1 gene promoter methylation in patients with ulcerative colitis. *International journal of molecular medicine*, 23, pp.521–527.
- Tahara, T., et al., 2009. Promoter methylation of protease-activated receptor (PAR2) is associated with severe clinical phenotypes of ulcerative colitis (UC). *Clinical and experimental medicine*, 9(2), pp.125–130.
- Takeda, K. et al., 1997. Targeted disruption of the mouse Stat 3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, pp.3801–3804.
- Takeda, K. et al., 1998. This information is current as of Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation

- and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*, 161, pp.4652–4660.
- Targan, S.R. & Karp, L.C., 2005. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunologic Reviews*, 206, pp.296–305.
- Taylor, S.R.J., McCluskey, P. & Lightman, S., 2006. The ocular manifestations of inflammatory bowel disease. *Current opinion in ophthalmology*, 17(6), pp.538–544.
- Thompson, N.P. et al., 1996. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *Bmj*, 312, pp.95–96.
- Toribara, N.W. et al., 1993. Human Gastric Mucin. *The Journal of Biolo*, 268(8), pp.5879–5885.
- Tsukumo, S. et al., 2013. Bach2 maintains T cells in a naive state by suppressing effector memory-related genes. *PNAS*, 110(26), pp.10735–10740.
- Tysk, C. et al., 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut*, 29(7), pp.990–996.
- Tytgat, K.M.A.J. et al., 1996. Quantitative Analysis of MUC2 Synthesis in Ulcerative Colitis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224, pp.397–405.
- Ventham, N.T. et al., 2013. Beyond gene discovery in inflammatory bowel disease: the emerging role of epigenetics. *Gastroenterology*, 145(2), pp.293–308.
- Waddington, C.H., 1942. "The Epigenotpye." *Endeavour*, 1, pp.18–20.
- Walmsley, R.S. et al., 1998. A simple clinical colitis activity index. *Gut*, 43, pp.29–32.
- Welsch, U., 2003. *Lehrbuch Histologie*,
- Welte, T. et al., 2003. STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: A critical role of STAT3 in innate immunity. *PNAS*, 100(4), pp.1879–1884.
- Wenzel, U. a et al., 2014. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis. *PloS one*, 9(6), p.e100217.
- Winkler, C. et al., 2014. Feature ranking of type 1 diabetes susceptibility genes improves prediction of type 1 diabetes. *Diabetologia*, 57(12), pp.2521–2529.
- Wu, B. et al., 2011. Evolution of the IL17 receptor family in chordates: a new subfamily IL17REL. *Immunogenetics*, 63(12), pp.835–845.
- Xu, C. et al., 2013. Effect of Mst1 overexpression on the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the sensitivity to cisplatin in vitro. *Acta Biochim Biophys Sin*, 45(4), pp.268–279.
- Xu, L. et al., 2014. Association of STAT4 gene rs7574865G >T polymorphism with ulcerative colitis risk: evidence from 1532 cases and 3786 controls. *Archives of medical science*, 10(3), pp.419–424.

- Yakut, M. et al., 2010. Serum vitamin B12 and folate status in patients with inflammatory bowel diseases. *European journal of internal medicine*, 21(4), pp.320–323.
- Yashiro, M., 2014. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, 20(44), pp.16389–16397.
- Yin, C. et al., 2013. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 123(5), pp.1902–1910.
- Yu, N.-K., Baek, S.H. & Kaang, B.-K., 2011. DNA methylation-mediated control of learning and memory. *Molecular brain*, 4, p.5.
- Zhang, Y. & Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation : interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & development*, 15(1), pp.2343–2360.
- Zhu, H. et al., 2013. Polymorphisms of STAT4 and the risk of inflammatory bowel disease: A case-control study in Chinese Han population. *Biomedical reports*, 1(2), pp.320–324.



## 6. Anhang

### 6.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Histologischer Querschnitt eines Dünndarms. (A) Tunica serosa (B) Tunica muscularis (C) Tunica submucosa (D) Tunica mucosa (von außen nach innen). .....	2
Abbildung 1.2 Verteidigungsmechanismus einer gesunden intestinalen Mucosa-Barriere (Antoni et al. 2014). .....	4
Abbildung 1.3 Hochauflösende Weißlich-Endoskopie eines schweren Verlauf bei MC mit multiplen Ulzera und spontanen Blutungen der entzündeten Mucosa (Neumann et al. 2012).....	6
Abbildung 1.4 Hochauflösende Weißlich-Endoskopie einer schweren Proktitis (CU) mit starken spontanen Blutungen der entzündeten Mucosa (Paine 2014). .....	8
Abbildung 1.5 Verschiedene Gen-Loci die entweder mit CED (schwarz), MC (blau) oder CU (grün) assoziiert sind. Modifiziert nach (Ek et al. 2014).....	10
Abbildung 1.6 Schematische Illustration der Wirkungsweise der Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B. Modifiziert nach (Yu et al. 2011). .....	18
Abbildung 1.7 Rolle der Epigenetik in der Pathogenese von CED. Das klassische Paradigma eines Genotyps, der zu einem Phänotyp und dann zu einer Erkrankung führt, wurde durch die hauptätiologischen Faktoren in CED erweitert. Epigenetik (violett) interagiert mit genetischen Faktoren (blau) und Umweltfaktoren (grün) und beeinflusst das Immunsystem (orange). Durch die Immunantwort wird dann entschieden, ob eine Erkrankung ausgelöst wird oder die Veränderungen toleriert werden. (Renz et al. 2011; Kalla et al. 2014).....	19

Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Infinium I- und Infinium II-Technologie, auf dem der Infinium® HumanMethylation450 BeadChip aufgebaut ist.....	30
Abbildung 2.2 Graphische Darstellung der untersuchten Bereiche des putativen <i>IL17REL</i> Promoters. Das längste Insert (C1) hatte eine Länge von 798 bp, beinhaltete die in der DNA-Methylierungsuntersuchung analysierten CpGs und liegt -806 - -8 vor dem Transkriptionsstart. In den C2- und C3-Inserts (587 bp; -806- -219 und 361 bp; -806 - -445) sind die mittels Pyrosequenzierung analysierten CpGs nicht mehr enthalten. ....	35
Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des pGL4.10-Vektors (4242 bp), die die Restriktionsschnittstellen der einzelnen Enzyme und die Position der Gene für die Antibiotikaresistenz und des Luciferasereportergens zeigt. ....	36
Abbildung 3.1 Promotermethylierung in [%] von <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> gemessen im TI-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden TI-Proben von Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (**) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.....	46
Abbildung 3.2 Promotermethylierung in [%] von <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> gemessen im Colon-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden Colon-Proben von Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (**) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs. ....	48
Abbildung 3.3 Promotermethylierung in [%] von <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> gemessen im Colon-Gewebe von CU-Patienten und entsprechenden Colon-Proben von Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (**) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs. ....	50

Abbildung 3.4 Heat Map der 100 differentiell methylierten CpG-Sites mit der höchsten Signifikanz aus dem Vergleich der CU Colon E-Proben mit den Colon Kontrollproben.....	53
Abbildung 3.5 Heat Map der 100 differentiell methylierten CpG-Sites mit der höchsten Signifikanz aus dem Vergleich der CU Colon NE- mit den CU Colon E-Proben.....	54
Abbildung 3.6 Venn-Diagramm der signifikant ( $p < 0,001$ ; $\text{LogFC} > 1$ ) auffälligen CpG-Sites in den drei vergleichenden Analysen. ....	55
Abbildung 3.7 Netzwerk der relevanten Signalwege, zu welchen mindestens 20 Gene mit in der genomweiten Methylierungsanalyse nachgewiesener signifikanter differentieller Methylierung. ....	56
Abbildung 3.8 Balkendiagramm der 16 Signalwege, in denen eine große Anzahl an Gene eine Rolle spielen, die eine aberrante Methylierung in Colon-Proben der CU-Patienten im Vergleich mit den Colon-Proben der Kontrollpersonen aufwiesen. ....	57
Abbildung 3.9 Liste der Krankheiten, die mit in dieser Methylierungsstudie identifizierten Genen assoziiert sind, der Häufigkeit der Assoziation nach sortiert . ....	57
Abbildung 3.10 Methylierung in [%] von <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> gemessen in terminalem Ileum-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden Kontrollpersonen. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (**) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs.....	59
Abbildung 3.11 Methylierung in [%] von <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> gemessen im Colon-Gewebe von MC-Patienten und entsprechenden Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen	

Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs..... 61

Abbildung 3.12 Methylierung in [%] von *BACH2*, *STAT3*, *STAT4*, *STK4* und *WIPF1* gemessen im Colon-Gewebe von CU-Patienten und entsprechenden Kontrollpersonen. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs..... 63

Abbildung 3.13 dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) in den MC TI NE- (n=12) und MC TI E- (n=4) Gewebeproben sowie TI-Kontrollproben (n=13). Je niedrigerer der dCt-Wert desto höher die Expression des entsprechenden Gens. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs, graue Klammern mit p-Werten  $>0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich..... 67

Abbildung 3.14 dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) in den MC Colon NE- (n=25) und MC Colon E- (n=9) Gewebeproben sowie den Colon-Kontrollproben (n=24). Je niedrigerer der dCt-Wert desto höher die Expression des entsprechenden Gens. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs an, graue Klammern mit p-Werten  $>0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich..... 69

Abbildung 3.15 dCt-Werte der sechs analysierten Gene (*BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*) in den CU Colon NE- (n=23) und CU Colon E- (n=12) Gewebeproben sowie den Colon-Kontrollproben (n=24). Je niedrigerer der dCt-Wert desto höher die Expression des entsprechenden Gens. Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $\leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs..... 71

Abbildung 3.16 Ergebnisse der Expressionsanalysen (oben) und Methylierungsanalysen (unten) von *IL17REL* und *STAT4* in denselben MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben . Die Kreise und Sterne unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer bzw. extreme Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) zwischen den Boxplots beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs, graue Klammern mit p-Werten  $>0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich..... 73

Abbildung 3.17 Ergebnisse der Expressionsanalysen (oben) und Methylierungsanalysen (unten) von *IL17REL*, *MUC6* und *STAT4* in denselben MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs, graue Klammern mit p-Werten  $>0,05$  eindeutige, aber nicht signifikante Unterschiede für den jeweiligen Vergleich ..... 75

Abbildung 3.18 Ergebnisse der Expressionsanalysen (oben) und Methylierungsanalysen (unten) von *MUC2* in denselben CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben. Die Kreise unter oder über den Boxplots zeigen Ausreißer an. Doppel-Sternchen (\*\*) beschreiben eine Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) des jeweiligen Vergleichs..... 76

Abbildung 3.19 Relative Luciferase-Aktivität der drei analysierten Konstrukte (pGL4.10-*IL17REL\_C1*, pGL4.10- *IL17REL\_C2* und pGL4.10- *IL17REL\_C3*). Die Werte wurden mit dem pGL4.10-Leervektor verrechnet (nicht in Graphik dargestellt)..... 78

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Mögliche entzündliche Lokalisationen bei MC und entsprechende Symptome, sowie Montreal-Klassifikationen. ....	5
Tabelle 2.1 Auflistung aller gesammelten intestinalen Gewebeproben von gesunden Kontrollindividuen, MC-Patienten und CU-Patienten aus denen DNA isoliert wurde. ....	23
Tabelle 2.2 Auflistung aller gesammelten intestinalen Gewebeproben von gesunden Kontrollindividuen, MC-Patienten und CU-Patienten aus denen RNA isoliert wurde. ....	23
Tabelle 2.3 Primersequenzen zur genspezifischen Methylierungsuntersuchung. Die Primer, an deren 5'-Ende sich eine Biotinmarkierung befindet, sind mit (bio) gekennzeichnet. ....	26
Tabelle 2.4 Reaktionskomponenten zur Amplifizierung Bisulfit-behandelter gDNA. ....	27
Tabelle 2.5 PCR-Programm für die Amplifizierung von <i>IL17REL</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . ....	27
Tabelle 2.6 PCR-Programm für die Amplifizierung von <i>MUC2</i> . ....	27
Tabelle 2.7 PCR-Programm für die Amplifizierung von <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . ....	28
Tabelle 2.8 Primersequenzen für qRT-PCR. ....	33
Tabelle 2.9 Primersequenzen für die Herstellung der pGL4- <i>IL17REL</i> -Inserts C1-C3. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind rot markiert. ....	34
Tabelle 2.10 Zusammensetzung der Komponenten für einen Doppelverdau mit <i>XhoI</i> und <i>BglII</i> . ....	35

---

Tabelle 2.11 Zusammensetzung der Ligationsreaktion, in der das jeweilige Insert (C1-C3) mit dem leeren pGL4.10 zusammengefügt wurde. ....	37
Tabelle 2.12 Komponenten der Amplifikationsreaktion zur Überprüfung der Transformation der pGL4.10-IL17REL-C1, C2 und C3-Konstrukte in kompetente E.coli Zellen mittels Kolonie-PCR.....	38
Tabelle 2.13 PCR-Programm zur Durchführung der Kolonie-PCR.....	39
Tabelle 2.14 Zusammensetzung des Mastermix für die Sequenzreaktion. ....	40
Tabelle 2.15 PCR-Programm zur Durchführung der Sequenzreaktion.....	40
Tabelle 3.1 Gruppenvergleiche für terminales Ileum-Gewebe von Morbus Crohn-Patienten und Kontrollpersonen. ....	44
Tabelle 3.2 Gruppenvergleiche für Colon-Gewebe von Morbus Crohn-Patienten und Kontrollpersonen. ....	44
Tabelle 3.3 Gruppenvergleiche für Colon-Gewebe von Colitis Ulcerosa-Patienten und Kontrollpersonen. ....	45
Tabelle 3.4 p-Werte der Vergleiche der MC TI NE- und MC TI E-Proben mit den K TI-Proben für <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. ....	46
Tabelle 3.5 Promotermethylierung (Median) der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . ....	47
Tabelle 3.6 p-Werte der Vergleiche der MC Colon NE- und MC Colon E-Proben mit den Colon-Kontrollproben für <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt.....	48

---

Tabelle 3.7 Promotermethylierung (Median) der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . .....	49
Tabelle 3.8 p-Werte der Vergleiche der CU Colon NE- und CU Colon E-Proben mit den Colon Kontrollproben für <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. ....	50
Tabelle 3.9 Promotermethylierung (Median) der CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben für <i>IL17REL</i> , <i>MUC2</i> , <i>MUC6</i> und <i>MUC15</i> . ....	51
Tabelle 3.10 p-Werte der Vergleiche der MC TI NE-, MC TI E- und TI Kontrollproben für <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. ....	60
Tabelle 3.11 Methylierung (Median) der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . ....	60
Tabelle 3.12 p-Werte der Vergleiche der MC Colon NE- und MC Colon E- und Colon-Kontrollproben für <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . ....	62
Tabelle 3.13 Methylierung (Median) der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . ....	62
Tabelle 3.14 p-Werte der Vergleiche der CU Colon NE-, CU Colon E- und Colon-Kontrollproben für <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . ....	64
Tabelle 3.15 Methylierung (Median) der CU Colon NE-, CU Colon E- und K Colon-Proben für <i>BACH2</i> , <i>STAT3</i> , <i>STAT4</i> , <i>STK4</i> und <i>WIPF1</i> . ....	64
Tabelle 3.16 Vergleich der mittels Infinium® HumanMethylation450 BeadChip und mittels Pyrosequenzierung generierten Methylierungswerte der fünf untersuchten Gene ( <i>STK4</i> , <i>WIPF1</i> , <i>STAT3</i> , <i>BACH2</i> und <i>STAT3</i> ) für alle drei Untergruppen (K Colon, CU Colon NE und CU Colon E). ....	65



- 
- Tabelle 3.17 p-Werte der Expressionsvergleiche der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. .... 68
- Tabelle 3.18 p-Werte der Expressionsvergleiche der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. .... 70
- Tabelle 3.19 p-Werte der Expressionsvergleiche der CU NE- CU E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. .... 72
- Tabelle 3.20 p-Werte der Methylierungsvergleiche der MC TI NE-, MC TI E- und K TI-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Diese Werte beziehen sich auf die Daten des Teilkollektivs, bestehend aus den Patienten, aus deren Gewebe sowohl RNA als auch DNA isoliert werden konnte. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. .... 74
- Tabelle 3.21 p-Werte der Methylierungsvergleiche der MC Colon NE-, MC Colon E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Diese Werte beziehen sich auf die Daten des Teilkollektivs, bestehend aus den Patienten, aus deren Gewebe sowohl RNA als auch DNA isoliert werden konnte. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. .... 75
- Tabelle 3.22 p-Werte der Methylierungsvergleiche der CU NE-, CU E- und K Colon-Proben für *BACH2*, *IL17REL*, *MUC2*, *MUC6*, *STAT4* und *WIPF1*. Diese Werte beziehen sich auf die Daten des Teilkollektivs, bestehend aus den Patienten, aus deren Gewebe sowohl RNA als auch DNA isoliert werden konnte. Signifikante Werte sind in fett gedruckten Zahlen dargestellt. .... 77
- Tabelle 3.23 p-Werte der Vergleiche der relativen Luciferase-Aktivität von pGL4.10-IL17REL\_C1, pGL4.10-IL17REL\_C2 und pGL4.10-IL17REL\_C3. .... 78

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

5mC	5-Methylcytosin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin (bovine serum albumin)
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CCD-Kamera	Charge-coupled Device-Sensor basierende Kamera
cDNA	complementary DNA
CGI	CpG island (CpG-Insel)
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin (5'-3')
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNaseI	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
h	Stunde
H <sub>2</sub> O bidest.	doppelt destilliertes Wasser
kb	Kilobasen
M	molar (Molarität, Stoffmengenkonzentration)
MCS	multiple cloning site
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

---

NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
qPCR	quantitative PCR (Real-time PCR)
RNA	Ribonukleinsäure, ribonucleic acid
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative PCR auf cDNA zur Genexpressionsmessung
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	thermostabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
U	units
ÜN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel
vs.	Versus
w/v	Massenkonzentration

## 6.4 Lebenslauf