
**Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz**

**Expressionsunterschiede verschiedener miRNAs bei
chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von**

**Patrick Michael Felix Levien
aus Emmendingen**

Mainz, 2012

Wissenschaftlicher
Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

12.03.2013

A mighty flame can start as a little spark

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Herausforderungen und Hoffnungsschimmer	1
1.2	Fragestellung	3
2	Literaturdiskussion	4
2.1	Morbus Crohn	4
2.1.1	Geschichtlicher Hintergrund und Symptome	4
2.1.2	Epidemiologie und Prognose	4
2.1.2.1	Inzidenz und Prävalenz	5
2.1.2.2	Geschlechts- und Altersverteilung	6
2.1.2.3	Verlauf und Mortalität	6
2.1.3	Pathologie	7
2.1.3.1	Genetische Veränderungen	8
2.1.3.2	Umweltfaktoren	10
2.1.3.3	Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Flora	11
2.1.3.4	Funktionsstörungen der intestinalen Barriere	12
2.1.3.5	Dysregulation des Immunsystems	15
2.1.3.6	Zusammenfassung	17
2.1.4	Diagnosestellung	17
2.1.5	Beurteilung der Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn	18
2.1.6	Therapie	19
2.2	Colitis ulcerosa	20
2.2.1	Geschichtlicher Hintergrund und Symptome	20
2.2.2	Epidemiologie und Prognose	21
2.2.2.1	Inzidenz und Prävalenz	21
2.2.2.2	Geschlechts- und Altersverteilung	22
2.2.2.3	Verlauf und Prognose	22
2.2.3	Pathologie	22
2.2.3.1	Genetische Veränderungen	23
2.2.3.2	Umweltfaktoren	24
2.2.3.3	Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Flora	25
2.2.3.4	Funktionsstörungen der Schleimhautbarriere	26

2.2.3.5	Dysregulation des Immunsystems	28
2.2.3.6	Zusammenfassung	29
2.2.4	Diagnosestellung	29
2.2.5	Beurteilung der Entzündungsaktivität bei Colitis ulcerosa	30
2.2.6	Therapie	30
2.3	miRNA	32
2.3.1	Übersicht	32
2.3.2	Erstbeschreibung, Klassifikation und Benennung	32
2.3.3	Lokalisation und Entstehungsmechanismen der miRNAs	35
2.3.4	Wirkungsweise	38
2.3.5	Klinische Relevanz und Visionen	40
3	Material und Methodik	42
3.1	Materialien	42
3.1.1	Geräte	42
3.1.2	Software	42
3.1.3	Datenbanken	42
3.1.4	Chemikalien und Biochemikalien	43
3.1.5	Puffer	43
3.1.6	Enzyme	43
3.1.7	Analyse-Kits	43
3.1.8	Primer	44
3.2	Methodik	44
3.2.1	Datenerfassung	44
3.2.2	Biopsiematerial	45
3.2.3	Konservierung, Transport und Lagerung des Gewebematerials	45
3.2.4	Experimentelles Modell	46
3.2.4.1	Allgemeine Anmerkungen zum Umgang mit RNA	46
3.2.4.2	Präparationsverfahren zur Gewinnung der TotalRNA	46
3.2.4.3	TotalRNA-Analyse	48
3.2.4.4	Herstellung von cDNA	48
3.2.4.5	Identifikation relevanter miRNAs mit Hilfe eines Array-Systems	50
3.2.4.6	Durchführung von Echtzeit-PCR-Analysen	51
3.2.4.7	Methoden zur Quantifizierung und Effizienzbestimmung	53
3.2.5	Analyse von Datenbankinhalten über miRNAs	54

3.2.5.1	Quellcodes zur datenbankgestützten Untersuchung der von den miRNAs regulierten Proteine	56
3.2.5.2	Cytoscape mit PlugIn ClueGO	57
3.2.6	Statistik	60
3.2.6.1	Einschlusskriterien	60
3.2.6.2	Ausschlusskriterien	60
3.2.6.3	Studiendesign	61
3.2.6.4	Fallzahl	61
3.2.6.5	Statistische Auswertung	61
4	Ergebnisse	63
4.1	Epidemiologische Darstellung des erfassten Kollektivs	63
4.1.1	Kontrollgruppe	63
4.1.2	Morbus Crohn	64
4.1.2.1	Nicht-entzündliche Biopsien bei Morbus Crohn	64
4.1.2.2	Entzündliche Biopsien bei Morbus Crohn	64
4.1.3	Colitis ulcerosa	65
4.1.3.1	Nicht-entzündliche Biopsien bei Colitis ulcerosa	65
4.1.3.2	Entzündliche Biopsien bei Colitis ulcerosa	65
4.1.4	Infektiöse Kolitis	66
4.1.4.1	Nicht-entzündliche Biopsien bei infektiöser Kolitis	66
4.1.4.2	Entzündliche Biopsien bei infektiöser Kolitis	66
4.1.5	Ausschluss von Konfoundern	66
4.2	Ergebnisse der MicroArray RT² Pathway Analyse	68
4.3	Untersuchung des Expressionsverhaltens der miRNAs im Gewebe des selben Patienten (Verbundene Analyse)	70
4.3.1	Vergleich von entzündetem zu gesundem Kolongewebe bei Patienten mit Morbus Crohn	70
4.3.2	Vergleich von entzündetem zu gesundem Kolongewebe desselben Patienten bei Colitis ulcerosa	72
4.4	Untersuchung des Expressionsverhaltens der miRNAs im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe (unverbundene Analyse)	74
4.4.1	Vergleich der miRNA-Expression von nicht-entzündlichem Kolongewebe zwischen Patienten mit Morbus Crohn und der Kontrollgruppe	75
4.4.2	Expression im entzündeten Kolongewebe bei Morbus Crohn	78

4.4.3	Expressionsverhalten der miRNAs im Bereich des terminalen Ileums bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zur Kontrollgruppe	81
4.4.4	Vergleich der miRNA-Expression von nicht-entzündlichem Kolongewebe zwischen Patienten mit Colitis ulcerosa und der Kontrollgruppe	84
4.4.5	Vergleich der miRNA-Expression bei Colitis ulcerosa-Patienten mit entzündeten Kolongewebe und dem nicht-entzündeten Kolongewebe der Kontrollgruppe	86
4.4.6	Expressionsverhalten der miRNAs bei infektiöser Kolitis im Vergleich zur Kontrollgruppe	89
4.4.7	Expressionsverhalten der miRNAs in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad der Erkrankung	91
4.5	Zusammenfassende Darstellung der erzielten Ergebnisse	95
4.6	Analyse von Datenbankinhalten zu den in der Expression veränderten miRNAs	97
4.6.1	Expressionsveränderungen der let-7d und der miR-22 im Rahmen eines floriden Morbus Crohn mit Befall des Kolons	97
4.6.2	Expressionsveränderungen der miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 im Rahmen eines floriden Morbus Crohn mit Befall des terminalen Ileums	101
4.6.3	Expressionsveränderungen der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 im Rahmen einer floriden Colitis ulcerosa mit Befall des Kolons	105
4.6.4	Expressionsveränderungen der miRNAs miR-18a und miR-185 im Rahmen der Remission	108
5	Ergebnisdiskussion	112
5.1	Experimentelles Modell	112
5.1.1	Maus versus Mensch	112
5.1.2	Aktivitätsbeurteilung ohne Goldstandard	113
5.1.3	Heterogenität der Biopsielokalisationen	114
5.1.4	Ausschluss von Konfoundern	115
5.1.5	RNA-Isolation	116
5.1.6	Qualitätssicherung und PCR-Verfahren	117
5.1.6.1	Qualitätssicherungsmaßnahmen	117
5.1.6.2	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	119
5.1.7	Das Für und Wider von Datenbankanalysen	120
5.2	Untersuchung der miRNA-Expression	121
5.2.1	Epidemiologie des Kollektives	121

5.2.2	miRNA Array-Systeme	123
5.2.3	Diskussion der getrennten und verbundenen Analyse	124
5.2.4	miRNA-Expression bei Morbus Crohn im Kolon	126
5.2.4.1	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der verbundenen Analyse	126
5.2.4.2	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der unverbundenen Analyse	127
5.2.4.3	Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten miRNA-Expressionsunterschiede im Rahmen eines aktiven Morbus Crohn	127
5.2.4.4	Vergleich mit der Literatur	128
5.2.4.5	Theoretische Abhandlung der gemeinsamen Wirkungsweise der miRNAs let-7d und miR-22 auf den Entzündungsprozess	130
5.2.5	miRNA Expression im terminalen Ileum	132
5.2.5.1	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des terminalen Ileums im Rahmen der verbundenen Analyse	132
5.2.5.2	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des terminalen Ileums im Rahmen der unverbundenen Analyse	133
5.2.5.3	Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten miRNA-Expressionsunterschiede im Bereich des terminalen Ileums	134
5.2.5.4	Vergleich mit der Literatur	134
5.2.5.5	Theoretische Abhandlung der gemeinsam Wirkungsweise der miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424	135
5.2.6	miRNA-Expression bei Colitis ulcerosa	138
5.2.6.1	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der verbundenen Analyse	138
5.2.6.2	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der unverbundenen Analyse	138
5.2.6.3	Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten miRNA-Expressionsunterschiede im Kolon von Colitis ulcerosa Patienten	139
5.2.6.4	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	139
5.2.6.5	Theoretische Abhandlung der gemeinsamen Wirkungsweise der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 im Rahmen einer floriden Colitis ulcerosa	142
5.2.7	miRNA-Expression im Rahmen einer Remission eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa	146
5.2.7.1	Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons und deren Verhalten in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad	146
5.2.7.2	Zusammenfassung der in dieser Arbeit entdeckten miRNA-Expressionsunterschiede im Bereich des Kolons	147

5.2.7.3	Vergleich mit der Literatur	147
5.2.7.4	Theoretische Abhandlung der gemeinsamen Wirkungsweise der miRNAs miR-18a und miR-185	148
5.2.8	miRNA-Expression im Rahmen einer infektiösen Kolitis	150
5.2.9	Zusammenfassung zur Beeinflussung durch die miRNAs	150
5.3	Bedeutung der Beeinflussung von miRNAs als zukünftige pharmakologische Ziele	151
6	Zusammenfassung	154
7	Literaturverzeichnis	156
8	Anhang	177
8.1	Vergleich von Datenbankinhalten zu den in der Expression veränderten miRNAs	177
8.2	Der NF-kB-Signalweg	178
8.3	Statistische Angaben zu den mit der Software Cytoscape und dem Plug-In ClueGO erhobenen Daten	179

Abkürzungsverzeichnis

APC	Andenomatous polyposis coli
ASCA	Anti-Saccharomyces cervisiae Antibodies
ATG16L1	Autophagy related gene 16-like 1
CARD15	Caspase recruitment domain familiy, member 15
CCR6	Chemokine (C-C motif) receptor 6
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
CP	crossing point
Ct	Cycle of threshold
E2F2	Transcription factor 2
ECM1	Extracellular matrix protein 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmic reticulum
GRP	Gastrin-releasing peptide
HIF	Hypoxia-inducible factor
HNF4	Hepatocyte nuclear factor 4
ICOSLG	Inducible T-cell-costimulator ligand
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase family, M
JAK2	Janus kinase 2
MDP	Muramyl dipeptid
miRNA	Synonym für microRNA
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NOD2	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
nt	Nukleotid
OR	Odds-Ratio
p53	tumor protein p53
pANCA	Perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies
PPAR	Peroxisome Proliferator-activated receptor
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	engl. für Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RR	Relatives Risiko
SNP	Single nukleotide polymorphisms
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TRBP	Dicer and TAR RNA binding protein
UPR	Unfolded protein response
UTR	Untranslated region
WAS-Protein	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein

Tabellenverzeichnis

	Seite	
Tabelle 1	Genetische Veränderungen im IBD (Inflammatory Bowel Diseases) Locus bei Morbus Crohn	9
Tabelle 2	Risikofaktoren für die Entwicklung eines Morbus Crohn	11
Tabelle 3	Mikrobielle Veränderungen im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	12
Tabelle 4	Scoringsysteme zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn (Auszug)	19
Tabelle 5	Risikofaktoren und protektive Faktoren in der Pathogenese der Colitis ulcerosa	25
Tabelle 6	Erkenntnisse zu mikrobiellen Veränderungen im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung	26
Tabelle 7	Geräte	42
Tabelle 8	Software	42
Tabelle 9	Datenbanken	42
Tabelle 10	Chemikalien und Biochemikalien	43
Tabelle 11	Puffer	43
Tabelle 12	Enzyme	43
Tabelle 13	Analyse-Kits	43
Tabelle 14	Primer	44
Tabelle 15	Zuordnung der erfassten Wirkstoffe in Therapeutikaklassen	44
Tabelle 16	Parameter zur photospektrometrischen Beurteilung der Reinheit einer miRNA-Isolation	48
Tabelle 17	Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der reversen Transkription	50
Tabelle 18	Protokoll zur Herstellung von cDNA	50
Tabelle 19	Qualitätsgütekriterien des RT ² miRNA PCR Array System MAH-001A	50
Tabelle 20	Komponenten zur Durchführung einer Echtzeit-PCR	52
Tabelle 21	Protokoll zur Durchführung einer Echtzeit-PCR	52
Tabelle 22	Verwendete Datenbanken zur Untersuchung der Funktion, der Lokalisation und des Pathways der von den miRNAs regulierten Proteine	54
Tabelle 23	Darstellung der unter ClueGO ausgewählten Parameter zur Definition der Ausgabe der Netzwerkspezifität	59
Tabelle 24	Epidemiologischen Daten zum erfassten Probenkollektiv	63
Tabelle 25	Im Rahmen der verbundenen Analyse gewählte Biopsieorte bei acht Morbus Crohn Patienten/-innen	72
Tabelle 26	Die 10 am häufigsten von den miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine	99

Tabelle 27	Durch die miRNAs let-7d und miR-22 gemeinsam regulierten Pathways aus dem Bereich der Immunsystemantworten	100
Tabelle 28	Die 10 am häufigsten durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine	103
Tabelle 29	Durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 gemeinsam regulierten Pathways aus dem Bereich Immunsystemantworten und damit zusammenhängende Signalwege	104
Tabelle 30	Die 10 am häufigsten durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine	107
Tabelle 31	Die 10 am häufigsten durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine	110
Tabelle 32	In der Literatur aufgeführte Veränderungen im Rahmen einer Morbus Crohn	128
Tabelle 33	In Biopsien des terminalen Ileums nachgewiesene miRNA-Veränderungen bei Morbus Crohn	134
Tabelle 34	In der Literatur beschriebene miRNA-Veränderungen bei Colitis ulcerosa	139
Tabelle 35	In publizierten Arbeiten festgestellte miRNA-Expressionsveränderungen im Rahmen einer Remission einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung vom Typ Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa	147
Tabelle 36	Übersicht der pharmakologischen Strategien zur Beeinflussung der miRNA-Expression	153
Tabelle 37	Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d und miR-30e regulierten Proteine	179
Tabelle 38	Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine	180
Tabelle 39	Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine	181
Tabelle 40	Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine	182

Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abbildung 1	Weltweite Inzidenz des Morbus Crohn	5
Abbildung 2	Gegenseitige Beeinflussung unterschiedlicher Faktoren in der Entwicklung des Morbus Crohn	7
Abbildung 3	Pathway der „Unfolded Protein Response“	12
Abbildung 4	Zytokinschaukel bei Morbus Crohn	16
Abbildung 5	Weltweite Inzidenz der Colitis ulcerosa	21
Abbildung 6	Das multifaktorielle Geschehen der Pathogenese bei Colitis ulcerosa	23
Abbildung 7	Unterschiedliche Lokalisation der miRNAs innerhalb des menschlichen Genoms	35
Abbildung 8	Biogenese der miRNAs im Nukleus	37
Abbildung 9	Biogenese (II) und Funktion der miRNAs	40
Abbildung 10	Prinzip der miRNA Amplifikation	49
Abbildung 11	Ablaufschema der datenbankgestützten Untersuchung	56
Abbildung 12	Screenshots vom Juni 2012 der Eingabemaske von Cytoscape mit geladenem Plug-In	59
Abbildung 13	Korrelationsuntersuchung der miRNAs in der Kontrollgruppe	67
Abbildung 14	Korrelationsuntersuchung der miRNAs bei Patienten mit Colitis ulcerosa	68
Abbildung 15	Ergebnisse der miArray Analyse (Stand: 01.11.2009)	69
Abbildung 16	Untersuchung des Expressionsverhaltens von miRNAs im gesunden und entzündeten Dickdarmgewebe innerhalb eines Patienten bei Morbus Crohn	71
Abbildung 17	Expressionsverhalten von miRNAs zwischen gesundem und entzündetem Dickdarmgewebe bei Colitis ulcerosa	74
Abbildung 18	Expressionsverhalten von miRNAs im nicht entzündlichen Dickdarmgewebe	77
Abbildung 19	Expressionsverhalten von miRNAs im Dickdarmgewebe bei entzündlicher Erkrankung im Vergleich zu den nicht-entzündlichen Dickdarmbiospie der Kontrollgruppe	80
Abbildung 20	Expressionsverhalten von miRNAs im terminalen Ileum	83
Abbildung 21	Expressionsverhalten der miRNAs im gesunden Dickdarmgewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zum Kontroll – und Morbus Crohn-Kollektiv	85
Abbildung 22	Expressionsverhalten von miRNAs im entzündeten Kolon bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Gruppenvergleich	88
Abbildung 23	Expressionsverhalten von miRNAs im entzündeten Kolon bei Patienten mit infektiöser Kolitis im Gruppenvergleich	90
Abbildung 24	Entwicklung der miRNA-Expression in Abhängigkeit vom in der Histologie beurteilten Entzündungsgrad	93
Abbildung 25	Zusammenfassende Ergebnisdarstellung der durchge-	96

	fürten Tests	
Abbildung 26	Lokalisation der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine	97
Abbildung 27	Funktion der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine	98
Abbildung 28	Pathways der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine	99
Abbildung 29	Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine aus dem Bereich der Immunsystemprozesse	101
Abbildung 30	Pathway der durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine	102
Abbildung 31	Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs 30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine aus dem Bereich Immunsystemprozesse	105
Abbildung 32	Pathway der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine	106
Abbildung 33	Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine	108
Abbildung 34	Pathway der durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine im Rahmen einer Remission	109
Abbildung 35	Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine aus dem Bereich Immunsystemprozesse	111
Abbildung 36	Pathway und Funktion der Spermine Oxidase (SMOX)	145
Abbildung 37	Vergleich der räumlichen Verteilung der miRNAs	177
Abbildung 38	Vergleich der wahrgenommenen Funktionen der untersuchten miRNAs	177
Abbildung 39	Vergleich der durch die untersuchten miRNAs regulierten Pathways	177
Abbildung 40	Protein-Treffer zu den 10 am häufigsten durch die jeweiligen miRNA regulierten Proteine	178
Abbildung 41	Vereinfachte Darstellung des Nf-kB-Signalweges	178

1 Einleitung

1.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen: Herausforderungen und Hoffnungsschimmer

Die beiden bedeutendsten Vertreter an chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen stellen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa dar. Beide Erkrankungen manifestieren sich dabei als chronische Entzündungen des Gastrointestinaltraktes.

Colitis ulcerosa weist ein streng auf das Kolon beschränktes, mukosales Entzündungsbild auf, welches stets im Rektum beginnt und sich gegebenenfalls in Form einer kontinuierlichen Entzündungsstrecke durch das gesamte Kolon (Pancolitis) bis ins terminale Ileum (Backwash Ileitis) fortsetzen kann.

Die Erkrankung Morbus Crohn hält sich bei ihrer Manifestation an keine Kontinuität, sondern kann im gesamten Gastrointestinaltrakt beginnend beim Mund bis zum After auftreten. Dabei ist es möglich zwischen entzündlichen Anteilen und gesunden Anteilen zu differenzieren. Typisch für die Erkrankung sind vor allem der Befall des terminalen Ileums, sowie eine transmurale und somit tieferreichende Entzündungsreaktion.

Die Entzündungsreaktionen gehen mit massiven Beeinträchtigungen der Patienten in ihrem körperlichen, psychischen und sozialen Befinden einher. Klinisch stehen starke, unkontrollierbare Schmerzen, teils blutige Diarrhoen, Gewichtsabnahme und Leistungsminderung im Vordergrund. Durch das Gefühl, der Erkrankung hilflos ausgeliefert zu sein, wird die Entstehung von psychischen Komorbiditäten wie etwa Depressionen begünstigt. Langfristig gesehen müssen die Patienten sogar über das erhöhte Risiko im Verlauf an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken und zu versterben aufgeklärt werden. Von medizinischer Seite kann bisher nur teilweise Abhilfe geschaffen werden, da trotz der Verwendung sehr moderner Therapieverfahren - wie etwa Immunmodulatoren oder Biologika (1) – gleichzeitig nach wie vor viele Patienten mit einer niedrigen bis ausbleibenden Antwort auf die Therapie beobachtet werden müssen. Auch eine Heilung ist trotz weltweiter Forschungsbemühungen noch nicht in Sicht. Auf Grund dieses massiven Leidensdruckes und der nach wie vor noch nicht optimalen Therapie sind dringend neue Ansätze nötig. Alarmierend sind zusätzlich auch die weltweit hohen und teilweise sogar stark steigenden Prävalenz- und Inzidenzzahlen. Im Jahre 2004 lag die Prävalenz in den USA bei 1,4 Millionen, in Europa bei 2,2 Millionen Betroffenen (2). In den bisherigen Niedrig-Inzidenz-Ländern in Südeuropa oder Asien wird hingegen

eine steigende Inzidenz verzeichnet (3). Folglich werden sich auch für das Gesundheitssystem in Zukunft neue Herausforderungen ergeben. Bereits jetzt liegen die direkten Kosten aus Sicht der gesetzlichen Krankenversicherung in Deutschland im Durchschnitt bei € 3.767,26 pro Jahr und pro Patient für die Therapie von Morbus Crohn (4) und bei € 2.477,72 pro Jahr und pro Patient für die Therapie der Colitis ulcerosa (5). Die indirekten Kosten dürften dabei deutlich höher liegen.

Um diesen Herausforderungen begegnen zu können, wird bereits seit über 75 Jahren die Pathogenese dieser Erkrankungen erforscht. An Hand von großen epidemiologischen Studien konnten bereits weltweit unterschiedlichste mögliche Faktoren, wie zum Beispiel Umweltfaktoren, Veränderungen in der Zusammensetzung der Darmflora, ethnische Abstammung, sowie genetische Häufung identifiziert werden. Mausmodelle halfen bereits dabei, das Gleichgewicht zwischen der mikrobiologischen Darmflora und der erworbenen sowie angeborenen Immunantwort zu verstehen. Gleichzeitig legten diese Modelle aber auch nahe, dass es zu auto-agressivem Verhalten gegenüber dem körpereigenen Darmgewebe kommt. Auch der Beweis, dass eine symptomorientierte, immunsupprimierende Therapie eine Remission einleiten kann, sorgten für eine Zuordnung von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zum Formenkreis der Autoimmunerkrankungen. Trotz aller dieser Bemühungen und Erkenntnisse bleibt die Frage nach dem eigentlichen Auslöser immer noch offen.

Mit der Entdeckung des lin-4-Gens durch R. Lee im Jahr 1993 wurde der Funke für ein völlig neuwertiges Konzept über Regulationsvorgänge innerhalb von Zellen entzündet, welches das Interesse renommierter Arbeitsgruppen weltweit entflammte. Der Hintergrund dafür ist, dass das Transkript dieses Gens eine kurze (22 nt), nicht codierende RNA darstellt, welche durch RNA-mRNA-Antisense-Interaktion die Translation des lin-14-Gens reguliert. Weitere Arbeiten führten zur Identifizierung zusätzlicher (Stand April 2009: 817 counts; 6553 Publikationen im „WEB OF KNOWLEDGE“; Stand 2012: 18226 counts für alle Spezies (Release 18, November 2011); 16037 Publikationen im „WEB OF KNOWLEDGE“) kurzer (21-25 nt) regulatorischer RNAs, welche als microRNAs (miRNA) zusammengefasst werden. Dabei stellte sich heraus, dass dieses Regulationsprinzip einen hochkonservierten, speziesunabhängigen Mechanismus darstellt. Ihre Beteiligung konnte von der Zellentwicklung über die Gewebedifferenzierung bis hin zu zahlreichen pathologischen Prozessen, darunter auch chronischen Entzündungen, nach-

gewiesen werden. Auf dieser Grundlage war es der pharmazeutischen Industrie bereits möglich, neue Therapeutika etwa gegen hämatologische Krebsformen sowie chronische Hepatitis C Infektionen zu entwickeln, welche derzeit in erfolgsversprechenden Studien überprüft werden. Somit stellen die miRNAs eine neue und entscheidenden Weiche dar, um einerseits zelluläre Prozesse näher verstehen zu können und andererseits neuartige Therapieprinzipien auf Basis der miRNA Regulation zu entwickeln, mit denen eine Einflussnahme auf Fehlfunktionen bereits auf hohem zellulären Regulationsniveau möglich ist.

Mit diesen Hoffnungen gehen die miRNAs derzeit als strahlender Stern der Zukunftsvisionen auf, besonders auch deshalb, weil neue Strategien zur Identifizierung der Pathogenesemechanismen oder zumindest neue und effektivere Therapiekonzepte entwickelt werden müssen. Noch zu klären ist jedoch, ob die Hoffnungen, die man in die Beeinflussung der miRNAs setzt, gerechtfertigt sind.

1.2 Fragestellung

Diese Arbeit setzt sich nun mit der Fragestellung auseinander, inwiefern miRNAs im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen von Bedeutung sind. Geklärt werden sollen dabei:

- 1) Existieren miRNAs, welche im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ein verändertes Expressionsverhalten aufweisen?
- 2) Existieren individuelle Unterschiede in der miRNA-Expression?
- 3) Liefern Datenbankanalysen Hinweise darauf, inwiefern diese miRNAs miteinander in Beziehung stehen und welche Prozesse sie in der Zelle regulieren?
- 4) Welche Bedeutung kann der Erforschung der miRNAs im Zusammenhang zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen beigemessen werden, um die zu Grunde liegenden Pathogenesemechanismen näher zu verstehen oder neue Therapiestrategien zu entwickeln?

2 Literaturdiskussion

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen lassen sich im Wesentlichen in zwei Hauptformen differenzieren: Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Beiden gemeinsam ist eine unangemessene Antwort des Immunsystems auf Mikroorganismen im Darm bei Menschen mit einer bestehenden genetischen Prädisposition. Im Folgenden werden die wichtigsten Inhalte zu den jeweiligen Erkrankungen aufgeführt. Anschließend erfolgt eine Einführung zu den miRNAs bezüglich ihrer Biogenese, ihrer Wirkungsweise und ihrer bisherigen klinischen Relevanz mit einer Aussicht auf ihr mögliches therapeutisches Potenzial.

2.1 Morbus Crohn

2.1.1 Geschichtlicher Hintergrund und Symptome

In den Autopsieberichten von Wilhelm Fabry (1612) und G.B. Morgagni (1769) findet man die ersten Beschreibungen zu der Erkrankung Morbus Crohn (6, 7). Jedoch ließ sich zum damaligen Zeitpunkt die Erkrankung noch nicht von tuberkulösen oder anderen infektiösen Darmerkrankungen mit Sicherheit ausschließen, so dass diese Berichte mit Vorsicht zu nehmen sind. Erst der schottische Chirurg T.K. Dalziel nahm im Jahre 1910 eine klare Differenzierung zwischen der Darmtuberkulose und den chronisch entzündlichen Schleimhautveränderungen mit unspezifischen Granulomen vor (7). Die Bezeichnung Morbus Crohn resultierte letzten Endes auf der klaren Beschreibung der Charakteristika der nicht tuberkulösen "Ileitis Terminalis" durch die Chirurgen B.B. Crohn, L. Ginzburg und G. Oppenheimer in einer gemeinsamen Veröffentlichung im Jahre 1932 (8).

Hieraus wird deutlich, dass die Erkrankung Morbus Crohn bereits eine lange Geschichte aufweist, deren klinische Entität auf den Beschreibungen aus dem Jahre 1932 resultiert. Die am häufigsten beschriebenen Symptome stellen dabei breiig-schleimiger Durchfall, Bauchschmerzen (auf Grund des Befalls der Ileozökalregion tendenziell eher im rechten Unterbauch), subfebrile Temperaturen bis Fieber und Gewichtsverlust von 10 - 20 % dar. Die Schmerzen treten üblicherweise kolikartig vor dem Stuhlgang auf und lassen mit dem Ende der Defäkation nach (9).

2.1.2 Epidemiologie und Prognose

In den letzten 50 Jahren sind die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu einem der größten gastroenterologischen Probleme der westlichen Welt geworden. Daraus resultiert eine intensive Beschäftigung mit der Epidemiologie zu die-

sen Erkrankungsformen, mit einer großen Menge an deskriptiven Daten (10). Nicht verwunderlich ist es daher, dass abhängig von der Quelle, unterschiedliche Angaben gefunden werden können.

2.1.2.1 Inzidenz und Prävalenz

Die aktuellsten Daten zur Inzidenz von Morbus Crohn in Deutschland stammen aus der Oberpfalz, da hier seit 2004 im Rahmen des Kompetenznetzwerkes eine Inzidenzkohorte aufgebaut wird. Gemäß dieser Daten liegt für diesen Raum die Inzidenz von Morbus Crohn bei $6,6/10^5$ Neuerkrankungen pro Jahr, welche somit dem erwarteten oberen Inzidenzbereich entspricht (11). Gemäß den Angaben des statistischen Bundesamtes aus dem Jahr 2008 wurden im Krankenhaus im Schnitt 27 von 100.000 Einwohnern wegen eines Morbus Crohn behandelt. Die Gesamtfallzahl der im Krankenhaus behandelten Patienten blieb mit 22.107 Fällen (Jahr 2008) im Vergleich zu den Vorjahren stabil. Genaue und aktuelle Angaben zur Prävalenz von Morbus Crohn in Deutschland liegen derzeit nicht vor. Relativ aktuellen Daten aus Dänemark ermöglichen mit einer Prävalenz von 151 Erkrankten unter 100.000 Einwohnern eine grobe Abschätzung einer möglicherweise vorherrschenden Prävalenz (12).

Einen Überblick zur Abschätzung der weltweiten Inzidenz liefert die folgende *Abbildung 1* aus dem "American Journal of Gastroenterology" (1):

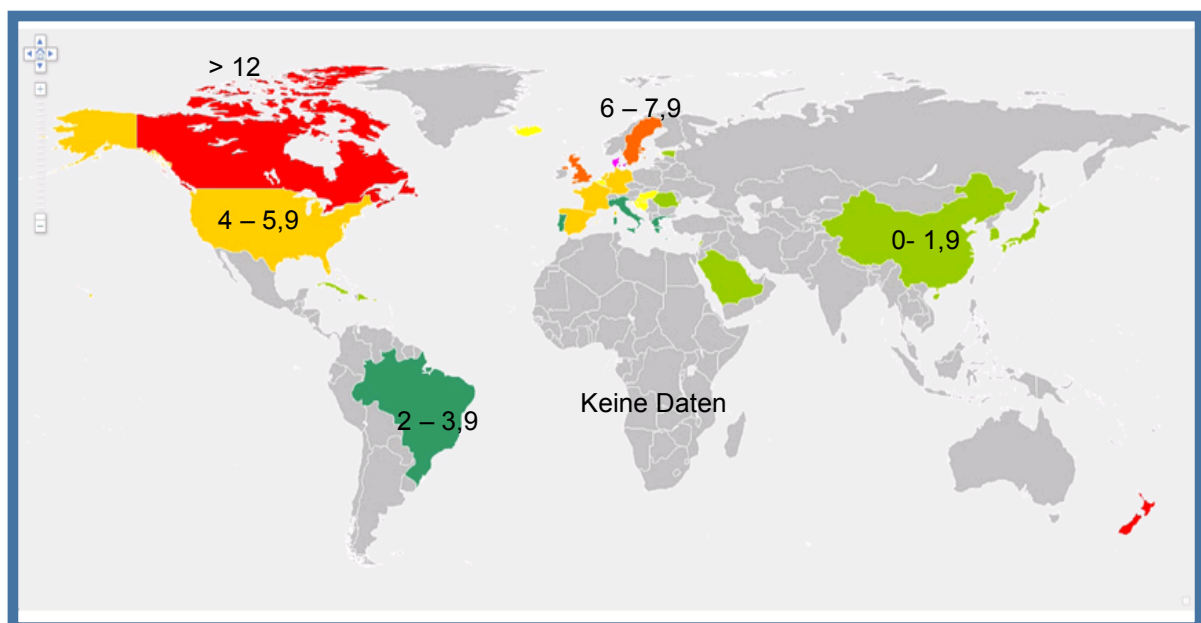


Abbildung 1 Weltweite Inzidenz von Morbus Crohn; In Deutschland: $6,6/100.000$ (2004) Neuerkrankungen, Prävalenz $151/100.000$. Abbildung übernommen und abgeändert aus dem American Journal of Gastroenterology 2011 (1).

2.1.2.2 Geschlechts- und Altersverteilung

Auch in neueren veröffentlichten Arbeiten bezieht man sich gerne auf die inzwischen etwas veralteten Daten der EC-IBD-Studie (1996) (13), da es sich bei dieser um die bestmögliche repräsentative Patientenkohorte mit erwachsenen Personen innerhalb Europas handelt. Hieraus wird eine Häufung von Morbus Crohn bei Frauen (relatives Risiko, RR = 1,2) angedeutet. Die höchste altersspezifische Inzidenz wird bei den 15- bis 24-Jährigen angegeben. Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass Kinder nicht berücksichtigt wurden. Gerade der Blick auf das Krankheitsgeschehen bei Kindern ist jedoch aus zwei Gründen sehr interessant: Zum einen konnten Daten aus Stockholm (14) im Gegensatz zur Colitis ulcerosa einen deutlichen Anstieg der Inzidenz des Morbus Crohn in den 90er Jahren bei Kindern darstellen, wobei jedoch betont werden muss, dass die chronisch-entzündliche Darmerkrankung bis zum 10. Lebensjahr sehr selten ist und zum 15. Lebensjahr dann deutlich in der Häufigkeit ansteigt. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass im Kindesalter überwiegend Jungen (Ratio = 2:1) an Morbus Crohn erkranken, in der Adoleszenz dieses sich jedoch zu einer höheren Erkrankungsrate bei Frauen verschiebt (15). Genauere Informationen erhofft man sich in der Zukunft jedoch aus dem Register CEDATA, welches am Helmholtz Zentrum München seit 2004 aufgebaut wird und bereits 2436 Kinder erfasst hat (16).

2.1.2.3 Verlauf und Mortalität

Der Verlauf einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ist sehr variabel und durch ihren schubartigen Charakter gekennzeichnet. Die Spannweite umfasst dabei Verläufe der jahrzehntelangen Remission (96 von 358 Patienten über 10 Jahre mit einer medianen Zeit zum ersten Schub bei 27 Monaten (17)) bis hin zu chronischen Verläufen mit langfristiger Immunsuppression, Operationen (auf Grund von Stenosen, Fisteln, Abszessen, Perforationen, Karzinomen), Ausbildung zahlreicher Folgeerkrankungen (insbesondere in Form eines Kolonkarzinoms) sowie der vorzeitigen Berentung. Die Operationsrate mit mindestens einer Operation lag bei Patienten mit ileozökalem Befall in der EC-IBD-Studie bei rund 34% nach 10 Jahren (17). Das Risiko an Darmkrebs zu erkranken lag gemäß einer Metaanalyse aus dem Jahre 2006 bei 2,9% nach 10 Jahren, bei 5,6% nach 20 Jahren und bei 8,3% nach 30 Jahren (18). Dabei fand sich im Vergleich zur Normalbevölkerung eine leichte Erhöhung des relativen Risikos (RR = 1,1; CI 95% 0,8 - 1,5) ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Das relative Risiko zur Entwicklung von einem

Adenokarzinom im Dünndarm war mit $RR = 31,2$ (CI 95% 15,9 - 60,9) hingegen hochsignifikant erhöht (18). Weitere Komplikationen stellen der Mechanische Ileus meist auf Grund fibröser Strikturen und Fisteln mit Verbindungen zur Haut, zum Anus, so wie zu weiteren Hohlorganen wie Blase und andere Darmabschnitte dar. Besonders der Ileus kommt dabei bei 20-30% der Patienten vor. Infektiöse Komplikationen stellen umkapselte Eiteransammlungen (Abszesse) oder die Entwicklung des toxischen Megakolons (2,3% der Patienten) dar (19). Extraintestinale Komplikationen sind Malabsorptionssyndrome mit Vitamin-D-Mangel, die Bildung von Gallen- und Harnsteinen, Augenentzündungen und Hautaffektionen. 56 – 65% der Patienten mit Morbus Crohn weisen bereits 10 Jahre nach Diagnosestellung mindestens eine dieser Komplikationen auf (20). Mit Blick auf die Mortalität wird im Gegensatz zur Colitis ulcerosa in der EC-IBD-Studie eine reduzierte 10-Jahres-Überlebensrate deutlich (17). In der aktuellen Metaanalyse von Canavan et al. zeigte sich in Bezug auf gleichaltrige und gleichgeschlechtige Personen aus der Normalbevölkerung ein um das 50% (SMR 1,52, CI 95% 1,32 -1,74) erhöhtes Risiko zu sterben (21). Zusammenfassend geht die Erkrankung Morbus Crohn mit einer schlechteren Prognose einher als die Colitis ulcerosa.

2.1.3 Pathologie

Die Entwicklung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen unterliegt einem multifaktoriellen Geschehen. Das heißt, dass durch unterschiedliche Faktoren wie Umweltfaktoren, genetischen Veränderungen, die Zusammensetzung der intestinalen bakteriellen Flora, die Leistung der intestinalen Barriere, oder auch die Funktionsfähigkeit des Immunsystems des Patienten die Entwicklung der Erkrankung begünstigt wird. Die *Abbildung 2* zeichnet ein Bild zu diesen unterschiedlichen Faktoren:

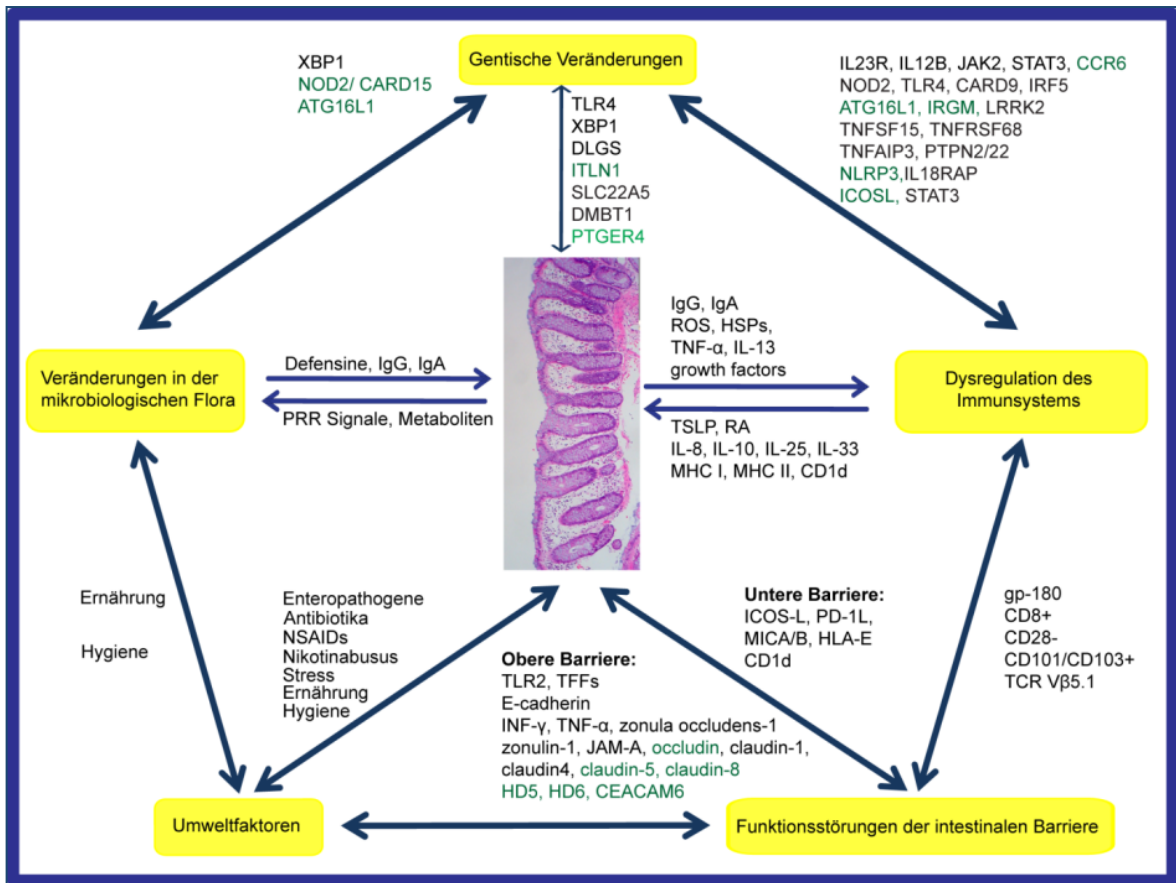


Abbildung 2 Gegenseitige Beeinflussung unterschiedlicher Faktoren in der Entwicklung von **Morbus Crohn**; schwarz = Gene, welche allgemein in Zusammenhang mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung stehen, grün = für Morbus Crohn spezifische Genpolymorphismen; Zusammenstellung gemäß der molekularen Pathways. Die Grundlage zu dieser Abbildung stammt aus einem Review von A. Kaser, S. Zeissig und R. Blumberg (veröffentlicht im Annual Reviews of Immunology; 2010 (22)) und wurde mit den Daten von MG Laukoetter et al. (23) und JV Limbergen et al. (24) ergänzt und modifiziert.

2.1.3.1 Genetische Veränderungen

Im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen konnten bereits bei einer Vielzahl von Genen Veränderungen festgestellt und mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden. In den von Halm et al. durchgeführten Untersuchungen wurde mit Hilfe von Zwillingsstudien bei monozygoten Zwillingen verdeutlicht, dass sich eine Konkordanz von 20 - 50% bei Morbus Crohn ergab (25). Diese Gene konnten teilweise bestimmten Loci auf unterschiedlichen Chromosomen zugeordnet werden, welche als IBD-Loci (Inflammatory Bowel Disease) bezeichnet und durchnummeriert wurden (vgl. *Tabelle 1*). Jedoch konnten noch nicht alle dieser Loci wiederholt bestätigt werden.

Vereinfachend codieren die im Rahmen eines Morbus Crohn veränderten Gene häufig Proteine, welche auf unterschiedlichen Wegen Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen:

Locus	Chr	Gen	Funktion	Quelle
Intrazelluläre Rezeptoren zur Erkennung von Oberflächen				
IBD1	16q12	NOD2/CARD15	Erkennung von bakteriellen Oberflächen, NF-κB-Signalweg	(26)
Intrazelluläre Signalmoleküle und -rezeptoren				
	1p13.3	PTPN22	T- Zell-Rezeptor Signalweg	(27, 28)
	8p11.3	PTPN2	Negativer Regulator der T-Zell-Aktivität	(29)
	6q23	TNFAIP3	Ubiquitierung veränderndes Enzym => Blockade des TNF-Rezeptor-Signalweges/ NF-κB-Weg	(30)
Extrazelluläre Rezeptoren				
IBD3	6p21.3	TNF, HLA, MHC	Erkennung von Oberflächen, Entzündungsregulation	(31)
Involviert in Autophagozytose-Prozess				
IBD10	2q37.1	ATG16L1	Autophagozytose	(32)
IBD19	5q33.1	IRGM	Autophagozytose	(33)
Expressionsregulation von Mediatoren				
IBD12	3p21	MST1, GNAI2	BSN, Expressionsregulation proinflammatorischer Mediatoren	(34)
IBD14	7q32	IRF5	Expressionsregulation proinflammatorischer Mediatoren	(35)
IBD23	1q32	IL10	Expressionsregulation proinflammatorischer Mediatoren	(36)
Zytokine und Zytokin-Rezeptoren				
IBD5	5q31	IL3, IL4, IL5, IL13	Entzündungsregulation	(37)
IBD17	1p31.1	IL23R	Th17-Zellen	(38)
	15q31.1	IL12B	Entwicklung von T-Zell Subtypen: Th1- und Th17-Zellen	(39)
Unklare Funktion bei nachgewiesenen Polymorphismen				
IBD2	12q	unklar	unklar - bei Colitis ulcerosa von größerer Bedeutung	(40)
IBD4	14q11	unklar	unklar	(41)
IBD6	19p	unklar	unklar	(37)
IBD7	1p	unklar	unklar	(42)
IBD8	16p	unklar	unklar	(43)

Tabelle 1 Genetische Veränderungen im IBD-Locus (Inflammatory Bowel Disease) bei Morbus Crohn; Darstellung der wichtigsten Gene und IBD-Loci mit nachgewiesenen Veränderungen bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. IBD-Loci spezifisch für Morbus Crohn sind grün dargestellt. Schwarz gefärbte Loci lassen sich sowohl bei Morbus Crohn als auch Colitis ulcerosa finden. Chr = Lokalisation auf dem entsprechenden Chromosom. Tabelle modifiziert nach einer Veröffentlichung von Blumberg et al. (44).

Intrazelluläre Oberflächenerkennungsrezeptoren: Besonders die durch das NOD2/CARD15 Gen codierten Rezeptoren dienen der Identifikation von Muramyl Dipeptiden (MDP) als Bestandteil der Zellwand von Bakterien. Veränderungen von dieser sind daher mit einer gestörten Antwort des Organismus auf seine Umgebung verbunden.

Produktion von Defensinen: Defensine sind Proteine im Gastrointestinaltrakt, welche zur Abwehr von Bakterien, Toxinen und Pilzen gebildet werden. Die Produktion ist besonders in Paneth-Zellen hoch (45), welche sich am Boden der intestinalen Krypten befinden und wird durch entzündungsfördernde Zytokine

wie etwa TNF- α verstärkt (46). Im Rahmen von Veränderungen des NOD2-Gens konnte ein absoluter α -Defensinmangel auf Grund einer noch ungeklärten Differenzierungsstörung der Paneth-Zellen gemessen werden (47).

Extrazelluläre Rezeptoren: Toll-like receptors (TLR-4,-2,-3 und-9) befinden sich auf der Zellmembranoberfläche und binden eine Vielzahl von Molekülen, zu denen unter anderem Bakterienbestandteile, Fusionsproteine von RS-Viren β -Defensin sowie Hitze-Schock-Proteine gehören (48). Es wurde bereits ein Zusammenhang von TLR-Veränderungen mit dem Schweregrad der Entzündungsreaktion in einer Fall-Kontroll-Studie nachgewiesen (49).

Autophagozytose: Darunter versteht man eine Vielzahl an unterschiedlichen Prozessen, beginnend beim Transport von zelleigenen Stoffen zu einem abbauenden Lysosom (50) bis hin zur Eliminierung von in die Zelle eindringender Organismen (51). Durch eine fehlerhafte Elimination von Pathogenen, einer Modulation des NF- κ B-Signalweges, der Tumorentstehung, der Resistenz vor dem induzierten Zelltod und der Beeinflussung der Funktion von Paneth-Zellen (52) ist dieser Weg bei Morbus Crohn besonders relevant für die Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses.

Zytokine und Zytokinrezeptoren: Studien belegen eine erhöhte Konzentration von IL23 und IL17 unter chronischer Entzündung des Darmes (53). Mit steigender IL17 Konzentration schütten die Epithelzellen des Darmes vermehrt CCL20 aus (54), welches über den „homing-Receptor“ CCR6 an dendritischen Zellen, T-Gedächtniszellen, Th17-Zellen sowie B-Zellen mobilisierend wirkt, indem es die gewebespezifische Migration in das Entzündungsgebiet begünstigt (55).

2.1.3.2 Umweltfaktoren

Es werden auf Grund der vielen deskriptiven Studien eine ganze Reihe unterschiedlicher Risikofaktoren mit den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht (2). Die einzelnen Risiko- sowie protektiven Faktoren werden in der *Tabelle 2* dargestellt:

Zur Tabelle sind jedoch noch folgende Aspekte anzumerken:

Diätfaktoren: Die Erfassung ist sehr problematisch. Zum einen besteht das Problem der Erinnerungs-Bias, da ein erheblicher Anteil der Patienten auf Grund der abdominellen Beschwerden bereits eine Modifikation des Essverhaltens vorgenommen hat, sich dessen aber auf Grund einer langen Latenzzeit zwischen

Symptomen und Diagnose nicht immer bewusst ist. Auch die Unklarheit, auf welchem Level die Ernährung wirkt, schränkt die Aussagekraft von Diätfaktoren ein.

Sheltered-Child-Hypothese: Überdurchschnittlich gute sanitäre Verhältnisse (Heißwasserversorgung, Spültoilette, wohnliche Situation, etc...) reduzieren frühkindliche enterische Infekte oder schieben diese auf, so dass bei prädisponierten Patienten bei späterer Infektion eine inadäquate Immunantwort erfolgt.

Cold-Chain-Hypothesis: Die Hypothese resultiert aus der Überlegung, dass im Kühlgut lebende Bakterien für die Erkrankung Morbus Crohn verantwortlich sind. Gestützt wird diese These durch die Zunahme der Inzidenz mit steigender Verbreitung von Kühlschränken. Beweisende Nachweise aus der Mikrobiologie, Epidemiologie und Immunologie fehlen jedoch aktuell noch zur Erklärung.

Faktor	Risiko	Bemerkung	Quelle
Stadt-Land Gefälle	neg	Urbaner Wohnsitz OR 1,5 (95% CI 1,1 - 2,0)	(56)
und Tierkontakt	prot	Viehkontakt OR 0,4 (95% CI 0,2 - 0,9)	
Diätfaktoren	prot	Obst, Ballaststoffe, Omega-3-FS	(57)
	neg	zuckerreiche, ballaststoffarme Kost	(58)
Stillen	neg	OR 2,1 (95% CI 1,3 - 3,4)	(59)
Pränatale Infektionen /	neg	OR 1,9 (95% CI 1,3 - 2,9)	
Frühkindliche Infektionen	neg	OR 2,2 (95% CI 1,6 - 2,9)	(60)
Frühgeburtlichkeit	neg	OR 1,5 (95% CI 1,1 - 2,0)	(60)
Hygiene	neg	Vgl. "Sheltered-Child-Hypothese" im Text	(61)
Maserninfektion	?	In der Literatur widersprüchlich beschrieben, wohl eher kein Effekt; Rubella-Infektion vielleicht protektiv	(62)
Mycobacterium paratuberculosis Infektion	?	Bakterien können häufig nachgewiesen werden, deren Bedeutung ist jedoch ungewiss	(63)
"Cold-Chain-Hypothesis"	neg	Vgl. im Text	(61)
Appendektomie		Häufung resultiert eher aus einer Bias	(64)
Rauchen	neg	Rauchen erhöht Befall des terminalen Ileums	(65)
	prot	und reduziert den Befall des Kolons	(65)
Orale Kontrazeptiva	neg	Kein eindeutiger Nachweis; RR 1,68	(66)
Berufliche Faktoren	neg	Sitzende Tätigkeit, Schichtarbeit, künstliches Licht, weniger körperliche Arbeit	(67)
Sozio-ökonomische Faktoren	neg	Höheres Einkommen => höherer Inzidenz für MC IRR 1,29 (95 % CI 1,08 - 1,54)	(68)
Psychische Faktoren	?	Nicht eindeutig belegt: Folge oder Ursache?	(69)
Ethnische Zugehörigkeit	?	Untersucht: Asiaten, Europäer, Afroamerikaner in den US sowie in Südafrika, jüdische Immigranten vs Juden in Israel	(70)

Tabelle 2 Risikofaktoren für die Entwicklung eines Morbus Crohn; Zusammenfassung der in der Literatur diskutierten Risikofaktoren; neg = Faktor, welcher die Entstehung eines Morbus Crohn begünstigt; prot = protektiv und reduziert somit die Entstehungswahrscheinlichkeit; OR = Odds Ratio, CI = Konfidenzintervall, RR = Relatives Risiko; IRR = Incidence rate ratio

2.1.3.3 Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Flora

Im menschlichen Darm leben zwischen 10^{13} - 10^{14} Bakterien, womit diese die Anzahl an Zellen im menschlichen Körper um das 10fache übersteigen (71). Dabei variiert die Besiedlung je nach Umgebung zwischen $0 - 10^2$ Bakterien im Magen bis zu 10^{11} - 10^{12} Bakterien im Dickdarm (72). Die Bereiche der dichtesten Besied-

lung (terminales Ileum mit ca. 10^7 - 10^9 Bakterien, sowie der Dickdarm) stellen auch die primären Manifestationsorte der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen dar (73). 99% dieser Bakterien lassen sich in vier Gruppen einteilen: 64% davon stellen die Firmicutes (insbesondere Clostridium IV und Clostridium XIV, Streptokokken und Lactobazillen). 23% sind Bacteroides. Mit 8% machen die Enterobakterien wie etwa Escherichia Coli einen sehr kleinen Anteil der Proteobakterien aus. Der kleinste Anteil wird mit 5% von den Actinobakterien gestellt, welcher sich unter anderem aus Actinomycineae und Corynebakterien ergibt (74). Im Rahmen des Entzündungsprozesses lassen sich vergrößerte Populationen an Enterobakterien (insbesondere Escherichia coli) sowie eine Abnahme der Firmicutes-Population (i.B. der Clostridien) nachweisen (74). Außerdem konnte das Mycobakterium avium vom Subtyp paratuberculosis bei Patienten mit der Erkrankung Morbus Crohn besonders häufig nachgewiesen werden (75). Weitere Belege für den direkten Zusammenhang zwischen den intestinalen Bakterien und der Krankheitsentstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen werden in der folgenden *Tabelle 3* zusammengefasst:

klinische Belege	Quelle
- Entzündungen in Bereichen der höchsten Bakterienkonzentration	(73)
- Untypische Zusammensetzung der Bakterien im Entzündungsgebiet	(76)
- Veränderung in der metabolischen Aktivität der Bakterien (weniger Butyrate, vermehrt Glycerol)	(77)
- Vermehrung von Mucosa-assoziierten Bakterien	(78)
- Gesteigertes durchdringen der Mukosa und erhöhte Translokation	(79)
- Gesteigerte Adhärenz und Invasivität von E. coli Bakterien	(80)
- Genpolymorphismen für bakterielle Rezeptoren und Abwehrmechanismen	(26, 32)
- Stuhlableitung schützt vor und reduziert Entzündungen; Wiederherstellung der normalen Stuhlpassage fördert Entzündungsprozesse	(81)
- Antibiotika vermindern den Schweregrad der Entzündung	(82)
experimentelle Belege	
- Darmflora zur Entzündungseinleitung in Mausmodellen benötigt	(83)
- Systemische Immundefekte können mit Darmentzündungen einhergehen	(84)
- Störungen des Signalweges auf bakterielle Bestandteile in Epithelzellen provozieren Entzündungen	(85)
- Störungen in der Abtötung von Bakterien induzieren Entzündungen	(86)

Tabelle 3 Mikrobielle Veränderungen im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen; schwarz = sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa feststellbar, grün = besonders bei Morbus Crohn relevant. Die Tabelle wurde nach dem Vorbild des Reviews von R. Balfour Sator (72) erstellt und modifiziert. Quellenangaben entsprechen den Originalquellen.

2.1.3.4 Funktionsstörungen der intestinalen Barriere

Die Aufrechterhaltung des intestinalen Gleichgewichtes wird über ein komplexes System in Form der "intestinalen Barriere" gewährleistet. Diese lässt sich in zwei

Funktionseinheiten unterteilen - einer einreihigen epithelialen Schicht, welcher eine dicke und schleimige Deckschicht aufgelagert ist und eine bunt gemischte untere Barrierschicht. Das einreihige intestinale Epithel nimmt dabei funktionell und anatomisch die zentrale Position ein. Störungen können jedoch beide Funktionseinheiten betreffen.

Die **obere epitheliale Barrierschicht** setzt sich aus vier unterschiedlichen Epithelzelltypen zusammen: den Paneth-, Becher- und enteroendokrinen Zellen sowie den resorbierenden Enterozyten. Die Becherzellen produzieren eine dicke schleimige Schutzschicht aus Glycokalix und "trefoil factors (=TFFs)", welche auf diese Weise die Enterozyten vor dem Kontakt mit pathogenen und invasiven Keimen schützt (87). Dabei spielt die Dicke im Vergleich zur Viskosität der Schleimschicht eine untergeordnete Rolle (88). Die Glykokalix wird über die Paneth-Zellen zusätzlich mit antibakteriellen Peptiden in Form der Defensine angereichert. Die Peptidhormone der enteroendokrinen Zellen sind an Prozessen des Zellstoffwechsels, Reparaturvorgängen, Angiogeneseprozessen und der Differenzierung der Enterozyten beteiligt. Bei an Morbus Crohn erkrankten Patienten konnte man eine Volumenzunahme der Becherzellen mit einer verstärkter Schleimbildung bei gleichzeitiger Reduktion der Defensin- und Peptide-Konzentration messen (89). Neben der Schleimzusammensetzung spielen aber auch die Verbindung zwischen den einzelnen Epithelzellen über Zonulae adherentes (adherens junctions) sowie über Zonulae occludentes (tight junctions) eine Rolle. Durch die proinflammatorischen Zytokine $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ erfolgt eine reduzierte Produktion von E-Cadherin, wodurch sich eine Störung der Cadherin-Catenin-Verbindung bei den Zonulae adherentes ergibt (90, 91). Von größerer Bedeutung ist jedoch die Funktionsstörung der Zonula occludens (92), welche unter Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen eine Schwächung des interepithelialen Zusammenhaltes erfährt. Dadurch wird die Penetration durch Bakterien erleichtert.

Die **untere Barrierschicht** bestehend aus T- und B-Lymphozyten nimmt vor allem eine regulierende Funktion ein. Durch die besondere Fähigkeit des intestinalen Epithels als unspezifische Antigen-präsentierende Zelle (APC) zu agieren, kann sie regulatorische T-Zellen unterhalb der Epithelschicht aktivieren (93). Dabei wird nicht auf die gewöhnlichen Kostimulatoren CD80 oder CD86 zurückgegriffen, sondern ICOS-L (inducible costimulatory ligand) und PD-1L (programmed death-1 ligand) als Kostimulatoren exprimiert (94). Auf der anderen Seite werden

Epithelzellen über Zytokine als auch durch interzelluläre Kommunikationsverbindungen in ihrem Wachstum und ihrer Differenzierung durch Lymphozyten und T-Zellen beeinflusst. Diese gegenseitige Kommunikation weist im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Störung auf Höhe der Präsentationsfähigkeit der Epithelzellen auf, wodurch es zu einer verminderten Aktivierung von regulatorischen T-Zellen kommt (95).

Ein letzter Aspekt zur Aufrechterhaltung der normalen Epithelfunktion stellt der in *Abbildung 3* schematisierte **Pathway der "Unfolded protein response (= UPR)"** im Rahmen von "endoplasmic reticulum stress" dar. An Hand dieses Pathways konnte auch die enge Gen (insbesondere XBP1) -Umwelt-Interaktion im Pathogeneseprozess verdeutlicht werden, wobei auch hierbei wieder die Paneth-Zellen von zentraler Bedeutung sind (96). Bei der "Unfolded Protein Response" handelt es sich um eine Antwort des Körpers auf die vermehrte Entstehung und Ansammlung von ungefalteten oder falsch gefalteten Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum (ER) im Rahmen von Stress (97). Stress wird in diesem Zusammenhang als ein Ungleichgewicht im Verhältnis von Aufbau und Abbau von Edukten verstanden. Besonders produzierende, sekretorische Drüsen - im Darm vor allem die Paneth-Zellen - sind daher stressanfällig. Um den Stress kompensieren und das Gleichgewicht wieder herstellen zu können, wird über die Bindung von falsch gefalteten Proteinen über grp78 (glucose-regulated protein 78) die Aktivierung des UPR eingeleitet. Die Folge ist Aktivierung einer Vielzahl an Anpassungsmechanismen, worunter die Translationshemmung, die Bereitstellung von Chaperonen und Autophagozytose- bis hin zu Apoptose-Prozessen verstanden werden. Die drei wichtigsten Säulen dieses Prozesses stellen PERK (pancreatic endoplasmatic reticulum kinase), ATF6 (activation factor 6) und IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) dar (98). Im Störfall eines dieser Arme erfolgt die Induktion des Immunsystems mit Entzündungen und dem Verlust der Paneth-Zell-Funktion durch Apoptose.

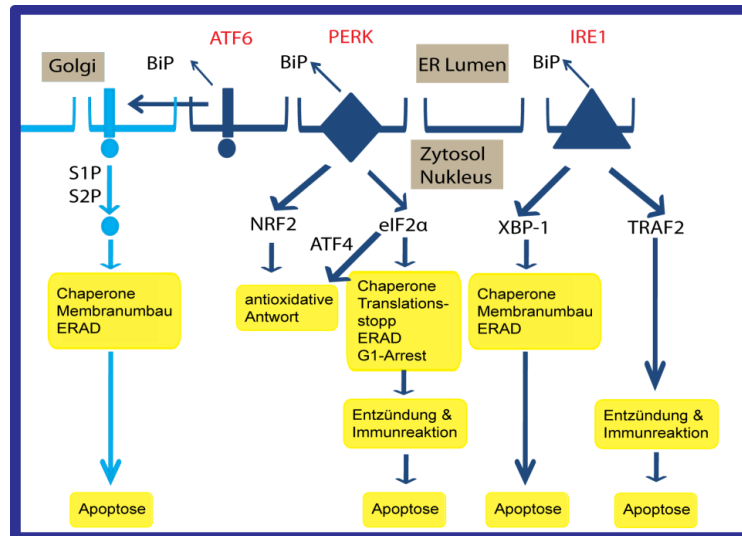


Abbildung 3 Pathway der "Unfolded Protein Response"; physiologische Antwort auf Stress im endoplasmatischen Retikulum gesteuert durch das UPR-System. ERAD = „endoplasmic-reticulum-associated protein degradation“. Abbildung modifiziert nach Vorlage von Schröder et al. (98).

2.1.3.5 Dysregulation des Immunsystems

Mausmodelle stellen ein essentielles Element in der Erforschung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen dar. An Hand dieser Modelle ließ sich eine dysregulierte Kommunikation zwischen Darmpathogenen und den Komponenten des angeborenen (im wesentlichen Makrophagen und dendritische Zellen) sowie des erworbenen Immunsystems (vor allem B- und T-Zellen) nachweisen.

Bei gesunden Menschen werden Makrophagen durch das muköse Milieu des Darmes dazu geprägt, einen antientzündlichen Phänotyp zu präsentieren. Dieses geschieht durch eine supprimierte Expression von Rezeptoren und proinflammatorischer Zytokine (99). Im Gegensatz dazu befinden sich bei Patienten mit Morbus Crohn deutlich mehr Makrophagen vom aktivierten und heterogenen Phänotyp (100), so dass sich eine gesteigerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-12 und TNF- α finden lässt (101) (vgl. hierzu auch *Abbildung 4*). Zusätzlich werden CD14+ Makrophagen aus dem Blutsystem akquiriert (102), welche im Vergleich zu gesunden und Colitis ulcerosa Patienten verstärkt IL-23 und TNF- α ausschütten (103).

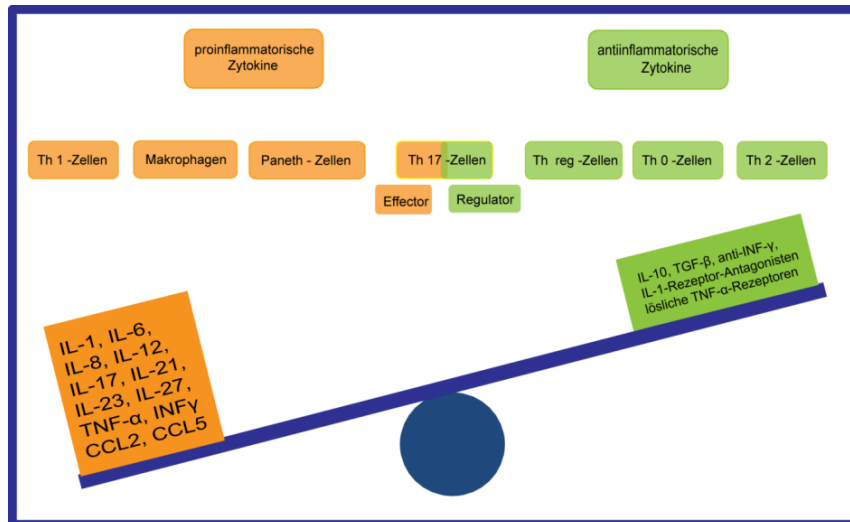


Abbildung 4 Zytokinschaukel bei Morbus Crohn; dargestellt ist das deutliche Überwiegen von proinflammatorischen Zytokinen im Zusammenhang mit der Erkrankung Morbus Crohn. Relevante Zellen in diesem Prozess sind Th1-Zellen, Makrophagen, sowie gestörte Paneth-Zellen. Th17-Zellen nehmen eine ganz besondere Rolle ein, da diese sich in zwei Gruppen, den Effektoren mit proinflammatorischen Zytokinen im Gegensatz zu den Regulatoren mit antiinflammatorischen Zytokinen und einer direkten inhibitorischen Einwirkung auf die Effektoren über IL-10 aufteilen lassen. Die durch Th_{reg}-, Th0- und Th2-Zellen produzierten antiinflammatorischen Zytokine können das „Gewicht“ der fehlregulierten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen nicht mehr aufwiegen, wodurch das Gleichgewicht aus den Fugen gerät.

Ähnlich wie die Makrophagen werden auch die dendritischen Zellen durch das mukosale Milieu geprägt, um auf diese Weise die Einleitung, aber auch die Regulation von Entzündungsreaktionen zu gewährleisten (104). Im Falle von Morbus Crohn ist die Rezeptordichte für mikrobielle Bestandteile erhöht und auch die Produktion von IL-12 sowie IL-6 gesteigert.

Sowohl bei Crohn- als auch bei Colitis ulcerosa- Patienten findet man eine gesteigerte Aktivität von B-Zellen in der Produktion von Immunglobulinen (IgA, IgM, IgG) im Blut sowie im Gewebe. Besonders Immunglobuline der Klasse IgG1, IgG2 und IgG3 sind gleichermaßen im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Morbus Crohn erhöht und unterscheiden sich somit von Colitis ulcerosa (nur IgG1) (105).

In den letzten Jahren rückten CD4+ T-Helferzellen in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses, da sich hieraus nicht nur grundlegende Erkenntnisse zur Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gewinnen ließen, sondern auch immunologische Regulations- und Reaktionswege verdeutlichten (106). Th1- sowie Th17- Zellen stellen bei Morbus Crohn die überwiegende Komponente der Immunantwort dar, was durch eine gesteigerte Produktion von IFN- γ , IL-12 (107) durch die Th1-Zellen sowie von IL-17 durch die Th17-Zellen in der Lamina propria der Darmwand deutlich wird (108). Außerdem ist auch das Interleukin IL-21 als regulierendes Zytokin der IL-17 Produktion vermehrt vorzufinden

(109). Interessant ist jedoch, dass die Th17-Zellen im Darm eine besondere Rolle einnehmen. So konnte in einer aktuellen Untersuchung durch Lochner et al. aus dem Jahre 2011 gezeigt werden, dass im Rahmen des Entzündungsprozesses von den Th17-Zellen durch die Ausbildung proinflammatorischer Zytokine auch eine gleichzeitige entzündungslimitierende Rolle eingenommen wird, da Immun-Zell-Follikel ausgebildet werden. Diese übernehmen letzten Endes die gezielte Steuerung der Immunreaktion im entzündeten Gewebe und könnten somit als eine Art Notfallplan des Darmes zur Eindämmung einer übermäßigen Immunreaktion verstanden werden (110). Genauere Untersuchungen hierzu stehen jedoch noch aus.

2.1.3.6 Zusammenfassung

Das aktuelle Konzept schlägt eine "Two-hit-Hypothese" als möglichen Erklärungsansatz für die Pathogenese der Erkrankung Morbus Crohn vor. Demnach ist die Akkumulation von genetischen und von Umweltfaktoren nötig, um den Patienten für die Erkrankung überhaupt anfällig zu machen. Eine Veränderung des Mikrobioms dieser prädisponierten Patienten führt mit Überwindung der intestinalen Barriere zu einer dysregulierten Immunantwort. Eine alleinige Veränderung der Bakterien-Kolonisation bei ausbleibender Veränderung der Immunfunktion würde nach diesem Modell noch nicht zu einer Ausbildung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung beitragen (96).

2.1.4 Diagnosestellung

Bedingt durch das heterogene Bild aus diversen Phänotypen setzt sich gemäß den in Deutschland gültigen Leitlinien die Diagnostik aus den Ergebnissen der Anamnese, des klinischen Erscheinungsbildes sowie einer Kombination aus laborchemischen, sonographischen, radiologischen, endoskopischen und histologischen Befunden zusammen.

In der Anamnese wird besonders auf die Leitsymptome chronischer Durchfall über 6 Wochen, abdominale Beschwerden und/oder Gewichtsverlust geachtet. Die Risikofaktoren Appendektomie, Nikotinkonsum und eine positive Familienanamnese geben neben Beschwerden im peripheren oder axialen Skelettsystem als häufigster extraintestinaler Manifestationsort weitere Hinweise. Bei der laborchemischen Untersuchung werden Entzündungsparameter (C-reaktives Protein, Blutsenkungsgeschwindigkeit), Hinweise für Blutungszeichen (Anämie, Vorliegen einer Thrombozytose), Anzeichen eines Flüssigkeitsdefizits (Elektrolyte, Blutbild) sowie

Zeichen der Mangelernährung beziehungsweise der Malabsorption (Vitamin B12) erhoben. Procalcitonin wird derzeit als ein potentieller Marker zur Abgrenzung von selbstlimitierenden Koliden postuliert (111). Auch fäkale Neutrophilenproteine wie Calprotectin, Lactoferrin (112) und S100A12 (113) ermöglichen eine Einschätzung der Entzündungsaktivität. Die Dünndarmdiagnostik kann mit Hilfe eines hochauflösenden Ultraschalles und ergänzend mit einer Magnetresonanztomographie des Bauchraumes erfolgen. Die endoskopische Ileocoloskopie ist für jeden Patienten obligatorisch durchzuführen und Mittel der ersten Wahl.

2.1.5 Beurteilung der Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn

Durch die endoskopische Diagnostik lässt sich zum einen das Befallsmuster (kontinuierlich versus diskontinuierlich), die Ausmaße des Entzündungsherdens und die Aktivität (SES-CD = Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease oder alternativ über den CDEIS = Crohn's Disease Index of Severity (114) beschreiben. Zusätzlich besteht die Möglichkeit Gewebeproben der entsprechenden Stellen zu entnehmen, um eine pathologische Beurteilung inklusive einer Aktivitätsbeurteilung durchzuführen.

Die Einteilung der Aktivität erfolgt in die vier unterschiedlichen Grade:

1. Remission (kein Hinweis einer Entzündung bei bereits bestätigter Diagnose)
2. Leichtgradige Entzündung
3. Mittelgradige Entzündung und
4. Schwergradige Entzündung.

Objektivieren lässt sich diese Einteilung über die in *Tabelle 4* auszugsweise dargestellten Scoring-Systeme bestehend aus summierten Punktwerten:

Harvey-Bradshaw-Index - Dieser Index besteht ausschließlich aus klinischen Variablen, wie etwa dem Allgemeinbefinden, der Stuhlfrequenz, Komplikationen wie extraintestinale Manifestationen sowie Gewichtsveränderungen.

CDAI (Crohn's Disease Activity Index) - Neben den klinischen Variablen des Harvey-Bradshaw-Index wird zusätzlich der laborchemische Parameter Hämatokritabfall berücksichtigt. Die jeweiligen Punkte werden außerdem durch Gewichtungsfaktoren unterschiedlich gewichtet.

Endoskopische Scoringssysteme - CDEIS oder der vereinfachte SES-CD werden herangezogen, um an Hand des Aussehens der Schleimhaut und ihrer Kontaktvulnerabilität den Aktivitätsgrad zu beurteilen.

Pathologische Scoringssysteme - Die international uneinheitliche Einteilung erfolgt an Hand des im Präparat vorgefundenen Zellbildes.

Entzündungsgrad	CDAI	Harvey-Bradshaw-Index	CDEIS	SES-CD	Pathologie (ggf. modifiziert durch Kryptenarchitekturstörung; Handhabung an der Universitätsmedizin Mainz)
Remission	< 150	< 5	< 3	0 – 2	normales Bild
leichtgradig	150 - 219	5 - 7	3 - 9	3 – 6	leichtgradiges Ödem, Granulozyten im Kryptenepithel
mittelgradig	220 - 449	8 - 16	9 - 12	7 – 15	Kryptenabszesse, verstärkte Entzündung
schwergradig	> 450	> 16	> 12	> 16	Ulzerationen, hochgradige Entzündung

Tabelle 4 Einteilungssystem zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn (Auszug); klinische Einteilungssysteme = CDAI, Harvey-Bradshaw-Index; endoskopische Einteilungssysteme = CDEIS, SES-CD; das pathologische Scoring richtet sich nach den Angaben der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz, da es international noch keinen klaren Score zur Klassifikation gibt .

2.1.6 Therapie

Die Therapie erfolgt auf Grundlage der zugrunde liegenden Krankheitsaktivität und beinhaltet eine Reduktion der Entzündungsaktivität. Dabei muss jedoch betont werden, dass weder medikamentöse noch chirurgische Interventionen eine kausale Therapie des Morbus Crohn darstellen. Außerdem bestehen unterschiedliche Philosophien bezüglich der Aggressivität des therapeutischen Vorgehens in Form einer step-up, also einer bei fehlendem Ansprechen immer aggressiver werdenden, versus einer top-down-Therapie, bei der ein möglichst aggressiver Therapiebeginn mit schnellstmöglicher Einleitung einer Remission bevorzugt wird, im Raum. In den S3-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Stoffwechsel- und Verdauungskrankheiten wird eine step-up Therapie als Therapiehilfe empfohlen, wovon grobe Auszüge im Folgenden dargestellt sind:

Bei leichter Krankheitsaktivität insbesondere im Bereich des terminalen Ileums kommt dabei bevorzugt Budesonid (Leitlinien: 9mg/d), also ein auf Grund seines hohen first pass Effektes topisch wirkendes Glucocorticoid zum Einsatz. Dieses ist der Behandlung mit 5-ASA, einem Amin-Derivat der Salicylsäure, überlegen (115).

Im Rahmen einer **mittelschweren Krankheitsaktivität** wird eine systemisch wirksame Glukokortikoidsubstitution mit Prednisolon (z.B. 1 mg/kg KG) vorgeschlagen (116).

Liegt bereits eine **schwergradige Entzündungsaktivität** vor, sollte bei inkompletem Ansprechen auf die systemische Glukokortikoidtherapie ein zusätzliches Immunsuppressivum in Form von Azathioprin (6-Mercaptopurin) verabreicht werden. Bei Unverträglichkeiten kann auf Methotrexat zurückgegriffen werden. Ein weiteres hochpotentes Mittel stellt die Therapie mit Antikörpern gegen den Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) dar, worunter die Wirkstoffe Infliximab, Adalimumab und Certolizumab fallen.

Konnte eine **Remission** erzielt werden, gilt es, diese möglichst lange aufrecht zu erhalten. Das Rezidivrisiko beträgt dabei im ersten Jahr 30 - 60% und im zweiten Jahr 40 - 70 % (117). Dazu erfolgt eine langsame Dosisreduktion der Steroide, wobei sich hierunter zeigt, ob ein steroidabhängiger (zwei gescheiterte Ausschleichversuche binnen 6 Monate) oder ein steroidunabhängiger Verlauf vorliegt. Generell sollten Steroide auf Grund ihrer zahlreichen Nebenwirkungen ausschließlich zur Akuttherapie Anwendung finden (118) und im Rahmen der Remissionshaltung durch Azathioprin/6-Mercaptopurin für mindestens vier Jahre ersetzt werden (119).

2.2 Colitis ulcerosa

2.2.1 Geschichtlicher Hintergrund und Symptome

Es wird angenommen, dass sich die „Mitteilungen“ in Form von Fallberichten von M. Bailles aus dem Jahre 1793 auf Patienten mit einer Colitis ulcerosa bezogen (6). Erst S. Wilks (1859) und ausführlicher W. Moxon (1875) lieferten detaillierte Beschreibungen zu der Dickdarmerkrankung, welche sie "simple ulcerative colitis" nannten (6). Im deutschen Sprachraum erfolgte die Einführung des Begriffes Colitis ulcerosa durch Ismar Boas bei einer Patientenvorstellung im Verein für Innere Medizin in Berlin im Jahre 1903, wobei er gleichzeitig die Anlegung einer Zoekalfistel zur Ruhigstellung des betroffenen Kolonabschnittes und zur antiseptischen ante- sowie retrograden Spülung mit Argentum und Jod vorschlug (120).

Typische Symptome der Erkrankung können blutige, schleimige oder eitrige Diarrhöen vom oftmals links-abdominalem, kolikartigen Schmerzcharakter sein. Die Defäkation führt dabei zur Schmerzreduktion. Außerdem kann der entzündliche Prozess im Rektum eine spastische Obstipation hervorrufen. Viele der Patienten beschreiben eine dranghafte Defäkation (reichend von 3 - 6 Stuhlgängen pro Tag bis hin zu stündlichen Defäkationen auch Nachts) mit teilweise subjektiv bewerteten inkompletten Stuhlentleerungen, die jedoch im Widerspruch zur abgesetzten

Stuhlmenge stehen (Pseudodiarrhö). Systemische Krankheitsverläufe werden mit Appetitsverlust, Müdigkeit, Leistungsminderung und oft mit Dehydratation einhergehender Gewichtsabnahme beschrieben (121).

2.2.2 Epidemiologie und Prognose

Wie Morbus Crohn gehört auch die Colitis ulcerosa zu einer sehr intensiv epidemiologisch untersuchten Erkrankung aus dem Formenkreis der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Daher lassen sich auch hier je nach Quelle unterschiedlichste Angaben finden.

2.2.2.1 Inzidenz und Prävalenz

In der aktuellsten Studie von Ott et al. aus dem Jahre 2008 lag die Inzidenz der Colitis ulcerosa in der Oberpfalz bei $3,9/10^5$ Neuerkrankungen pro Jahr, womit ähnlich wie bei Morbus Crohn auch hierbei wieder der erwartete obere Inzidenzbereich erreicht wurde (11). Die Daten des statistischen Bundesamtes zeigen, dass die Anzahl der im Krankenhaus gestellten Diagnosen einer Colitis ulcerosa mit 15.713 im Jahr 2000, über 16.405 im Jahr 2004 auf aktuell 16.880 im Jahr 2008 leicht angestiegen ist. Im Schnitt wurden im Jahre 2008 20 von 100.000 Patienten wegen einer akuten Colitis ulcerosa im Krankenhaus behandelt. Die tatsächliche Prävalenz lässt sich an Hand der relativ aktuellen Olmsted-Daten aus Dänemark auf rund $214/10^5$ vermuten (12).

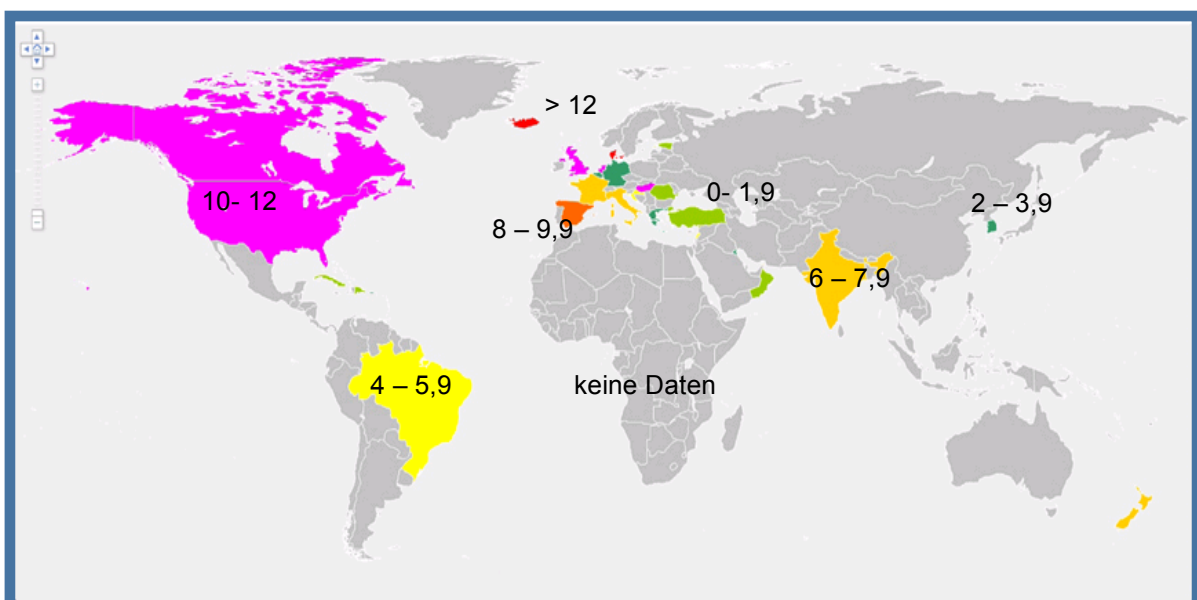


Abbildung 5 Weltweite Inzidenz der Colitis ulcerosa; grau = keine Daten vorhanden; hellgrün = 0 – 1,9; dunkelgrün = 2 – 3,9; gelb = 4 – 5,9; hellorange = 6 – 7,9; dunkelorange = 8 – 9,9; pink = 10 – 12; rot > 12 pro 100.000 Einwohner. Abbildung entnommen und modifiziert aus dem Journal of Gastroenterology 2012 (1)

Da Kinder immer mehr in den Fokus rücken, ist ein gesonderter Blick auf die Inzidenzzahlen bei diesen nötig. Obwohl es noch keine repräsentativen Untersuchun-

gen derzeit gibt, zeigten die Daten aus Stockholm in den 90er Jahren einen erheblichen Anstieg der Inzidenz bei Morbus Crohn, wohingegen die Inzidenz bei Colitis ulcerosa auf einem niedrigen Niveau von $2,2/10^5$ Einwohner stabil blieb (14). Die weltweiten Daten zur Inzidenz werden in der folgenden *Abbildung 5* aus dem "American Journal of Gastroenterology" veranschaulicht.

2.2.2.2 Geschlechts- und Altersverteilung

Die Daten der EC-IBD-Studie (Jahr 1996) zeigen, dass im Gegensatz zu Morbus Crohn Frauen tendenziell seltener von einer Colitis ulcerosa betroffen sind (Relatives Risiko 0,8 für Frauen) (12). Ein weiterer Unterschied zum Morbus Crohn stellt ein um 5 - 10 Jahre späteres Auftreten der Colitis ulcerosa dar. Das mediane Erkrankungsalter wird dabei mit 35 Jahren in der Literatur angegeben (122). Für Kinder existieren derzeit noch keine repräsentativen Untersuchungen, es liegt jedoch nahe, dass das tatsächliche mediane Erkrankungsalter niedriger liegt.

2.2.2.3 Verlauf und Prognose

Auch bei der Colitis ulcerosa besteht ein erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. In einer Metaanalyse aus 116 Studien ergaben sich für das Auftreten eines kolorektalen Karzinoms Inzidenzzahlen von 2% nach 10 Jahren, von 8% nach 20 Jahren und von 18% nach 30 Jahren, wobei es Unterschiede abhängig von der geographischen Lage (USA versus Skandinavien) gab (123). Weitere Komplikationen stellen das toxische Megakolon (7,9% der Patienten) (19), Perforationen, schwere Darmblutungen, Narbenbildungen (Strikturen), Verbindungen zwischen der Körperoberfläche (äußere Fisteln) oder einem anderen Hohlorgan (innere Fisteln), abgekapselte Eiteransammlungen (Abszesse) sowie Entzündungen der Gallenwege mit konsekutiven Leberschädigungen (3% der Patienten), der Augen (5-8% der Patienten) und der Gelenke (bis zu 15% der Patienten) dar (124). Basierend auf den Daten der EC-IBD-Studie ergaben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe für die Colitis ulcerosa in Bezug auf das 10-Jahres-Überleben keine gesteigerte Mortalität (125).

2.2.3 Pathologie

Wie bei Morbus Crohn geht man auch im Pathogeneseprozess der Colitis ulcerosa von einem multifaktoriellen Geschehen aus, welches in der *Abbildung 6* dargestellt wird:

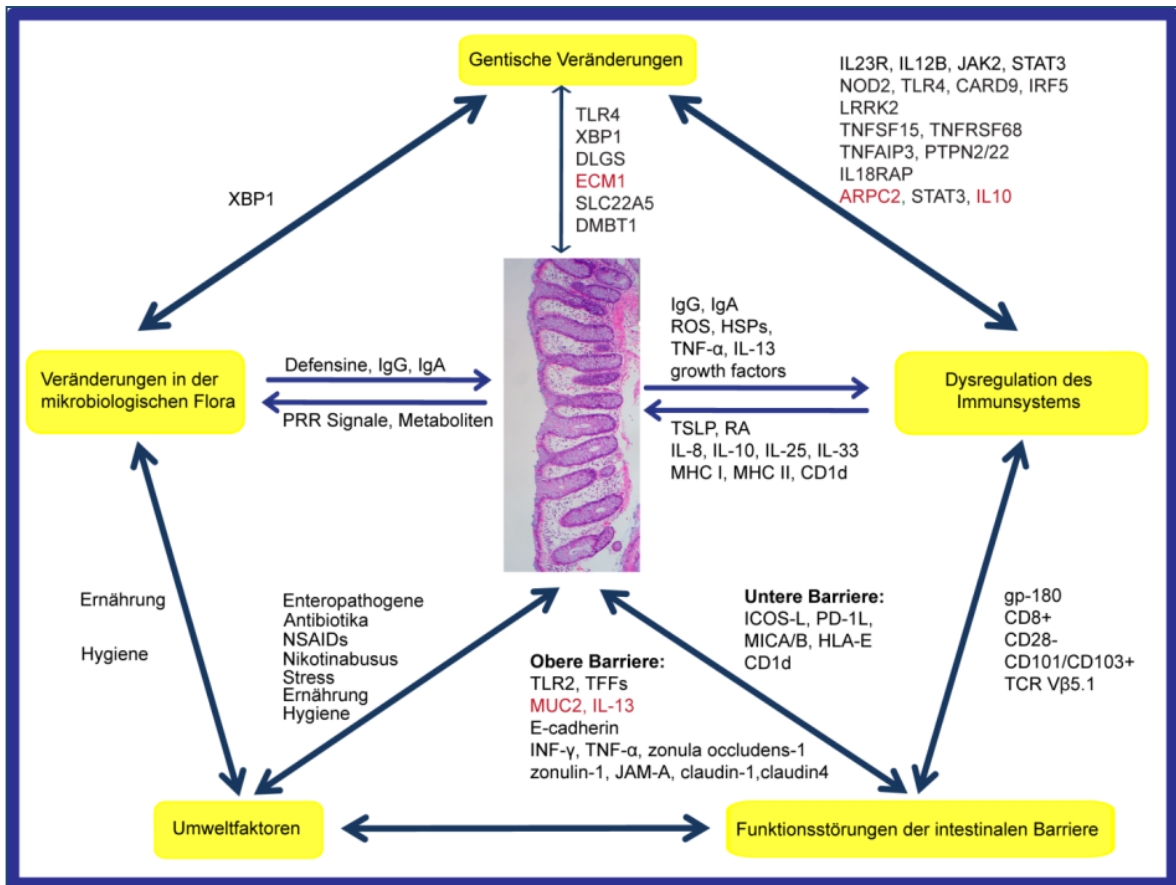


Abbildung 6 Das multifaktorielle Geschehen der Pathogenese bei Colitis ulcerosa; die Faktoren beeinflussen sich jeweils gegenseitig und überkreuzend. Schwarz = Gene bzw. Faktoren, welche allgemein mit der Entwicklung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung in Zusammenhang gebracht werden; rot = spezifische Veränderung für die Colitis ulcerosa; die Präsentation von Faktoren innerhalb eines gemeinsamen Pathways erfolgt auf einer Ebene. Die Abbildung wurde auf Grundlage der Darstellung im Review von A. Kaser, S. Zeissig und R. Blumberg (veröffentlicht im Annual Review of Immunology, 2010 (22)) erstellt und mit Daten von MG Laukoetter et al. (23), G. Roda et al. (126) und JV Limbergen et al. (24) modifiziert und ergänzt.

2.2.3.1 Genetische Veränderungen

Auch zur Colitis ulcerosa gibt es eine Vielzahl von Untersuchungen auf Genebene. Jedoch zeigt sich die Bedeutung der Gene bisher als weniger wichtig im Vergleich zum Morbus Crohn. Dieses wird auch in den von Halm et al. durchgeführten Untersuchungen an Zwillingsstudien bei monozygoten Zwillingen verdeutlicht, bei denen sich eine Konkordanz von 4 - 7% im Vergleich zu 20 - 50% bei Morbus Crohn ergab (25). Dennoch wurden in einem aktuelle Review von Thompson et al. die bedeutenden genetischen Veränderungen bei Colitis ulcerosa mit folgenden Kerninhalten herausgearbeitet (127):

Veränderungen in Regulationspathways - ARPC2 stellt ein Gen dar, dessen genaue Funktion noch unbekannt ist. Jedoch findet man auch Veränderungen in diesem Gen bei dem Wiskott-Aldrich-Syndrom, wobei es hierbei zu einer veränderten Regulationsfähigkeit des WAS-Proteins in der Regulation von T_{reg}-Zellen kommt (128). Somit wird vermutet, dass auch bei der Colitis ulcerosa Veränderun-

gen in diesem Gen mit Veränderungen in der Regulation von T_{reg}-Zellen einhergehen.

Störungen in der Sekretion von Proteinen - Die sekretorische Phospholipase A2 (PLA2G2) ist an der Formierung von proinflammatorischen Mediatoren beteiligt (129) und wird im Rahmen einer Colitis ulcerosa vermehrt sezerniert. Weitere Untersuchungen zu ihrer Bedeutung stehen jedoch noch aus.

Ubiquitinierung von Proteinen - Die Gene RNF186 und OTUD3 enthalten Informationen, welche zur Ubiquitinierung von Proteinen nötig sind (130). Im Allgemeinen kann somit die Regulation der Immunantwort erfolgen, etwa als negativer Regulator des Transkriptionsfaktors NF- κ B (131).

Immunantwort auf endogene oder exogene Peptidantigene - Die Regulierung der Peptidantigene erfolgt über Proteine, welche über HLA-Gene codiert sind. Bei Patienten mit höhergradigen und großflächigen Entzündungen, extraintestinalen Manifestationen wie Aphten, Uveitis und Arthritiden sowie bei Patienten mit therapierefraktären Verläufen konnte eine Assoziation zu Veränderungen des HLA DRB1*0103 Allels in der MHC-Region auf Chromosom 6 gezeigt werden (132).

2.2.3.2 Umweltfaktoren

Die *Tabelle 5* führt die bereits unter Morbus Crohn erwähnten Risikofaktoren erneut auf. Jedoch ist auf die Unterschiede der Wirkung der einzelnen Faktoren auf die Erkrankung zu achten. Deutlich werden somit folgende Unterschiede:

Stillen: Die Länge der Stillphase ist hierbei von zentraler Bedeutung. In einer Metaanalyse aus dem Jahre 2004 konnte gezeigt werden, dass die Muttermilchgabe protektiv auf die Entwicklung einer Colitis ulcerosa einwirkt (OR 0,77; 95% KI 0,61 – 0,96) (133). Eine große Fallkontrollstudie mit einer pädiatrischen Population zeigte jedoch gleichzeitig eine risikoerhöhende Wirkung, wenn über 5 Monate gestillt wurde (56).

Appendektomie: Die Risikoreduktion eine Colitis ulcerosa zu entwickeln gilt nur, wenn die Appendektomie im Kinder- oder Jugendalter durchgeführt wurde (OR 0,31; 95% KI 0,26 – 0,37) (134). Als Hintergrund werden hierfür physiologische Mechanismen, wie etwa eine Verschiebung der Balance zwischen Helfer- und Suppressorzellen des darmassoziierten Lymphgewebes diskutiert.

Nikotinkonsum: Nikotin wirkt im Dickdarm im Rahmen eines Dosis-Wirkungs-Effekt protektiv. So beträgt die OR für Raucher im Vergleich zum Nie-

malsraucher 0,4 (95% KI 0,3 – 0,5) (135). Je mehr geraucht wurde, desto geringer war dabei das Erkrankungsrisiko (136). Jedoch kippt der protektive Effekt mit dem Zeitpunkt der Beendigung. Je mehr geraucht wurde, desto höher ist das Risiko unter Abstinenz an einer Colitis ulcerosa zu erkranken. Das höchste Risiko besteht dabei für den Exraucher im ersten Jahr der Entwöhnung und nimmt mit zunehmender nikotinfreier Zeit sukzessive ab (135). Jedoch zeigen auch Exraucher trotz mehrjähriger Nikotinabstinenz ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko (OR 2,1) gegenüber den Niemals- oder Nicht-Rauchern.

Faktor	Risiko	Bemerkung	Quelle
Stadt-Land Gefälle und Tierkontakt	neg prot	Urbaner Wohnsitz OR 1,6 (95% CI 1,2 - 2,2) Viehkontakt OR 0,3 (95% CI 0,1 - 0,9)	(56)
Diätfaktoren	prot neg	Obst, Ballaststoffe, Omega-3-FS zuckerreiche, ballaststoffarme Kost	(137)
Stillen	prot neg	Risikoreduktion bei Stillen mit Muttermilch Risikorehöhung bei Stillen mit Säuglingsmilchnahrung	(59)
Pränatale / früh-kindliche Infektionen	neg neg	OR 1,6 (95% CI 1,0 - 2,4) OR 1,7 (95% CI 1,3 - 2,3)	(60)
Frühgeburtlichkeit	neg	OR 1,3 (95% CI 0,9 - 1,9)	(60)
Teilen eines gemeinsamen Kinderzimmers	neg	OR 7,1 (95% CI 1,9 - 27,4); multivariate Analyse für MC ohne Bedeutung	(59)
Hygiene	?		(61)
Maserninfektion	?	In der Literatur widersprüchlich beschrieben, wohl eher kein Effekt; Rubella-Infektion vielleicht protektiv gilt nur bei einer Durchführung im Kindes-/Jugendalter	(62)
Appendektomie	prot	OR 0,31 (95% CI 0,26 - 0,37)	(134)
Rauchen	prot neg	Raucher OR 0,4 (95% CI 0,3 - 0,5) Exraucher OR 1,6 (95% CI 1,4 - 2,0)	(135)
orale Kontrazeptiva	neg	kein eindeutiger Nachweis RR 1,68 (95 % CI 0,97 - 2,88) = wie bei MC	(66)
Berufliche Faktoren	neg	sitzende Tätigkeit, Schichtarbeit, künstliches Licht, weniger körperliche Arbeit	(67)
sozio-ökonomische Faktoren	neg	höheres Einkommen => höherer Inzidenz; geringere Bedeutung für CU (IRR 1,13; 95% CI 0,95 - 1,34))	(68)
Psychische Faktoren	?	nicht eindeutig belegt; Folge versus Ursache?	(69)
Ethnische Herkunft	?	Untersucht: Asiaten, Europäer, Afroamerikaner in den USA sowie in Südafrika, jüdische Immigranten versus Juden in Israel	(70)

Tabelle 5 Risikofaktoren (= neg) und protektive (= prot) Faktoren in der Pathogenese der Colitis ulcerosa; Fettdruck = Hinweis für Unterschied im Risiko im Vergleich zu Morbus Crohn; OR = Odds Ratio, CI = Konfidenzintervall, RR = Relatives Risiko, IRR = Incidence Relative Risk

2.2.3.3 Veränderungen der intestinalen mikrobiellen Flora

Ähnlich wie bei Morbus Crohn lässt sich auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa ein Ungleichgewicht ausgewählter Mikroorganismen vorfinden. Besonders relevant sind dabei Bakterien vom mukolytischen Typ wie etwa Ruminococcus gravus oder torques (138). Weitere Belege für den direkten Zusammenhang zwischen den intestinalen Bakterien und der Krankheitsentstehung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen werden in der *Tabelle 6* zusammengefasst:

klinische Belege	Quelle
- Entzündungen in Bereichen der höchsten Bakterienkonzentration	(73)
- Untypische Zusammensetzung der Bakterien im Entzündungsgebiet	(76)
- Verlust der Vielfalt in der Darmflora; i.B. Reduktion der Kommensalen	(139)
- Vermehrung von Mucus- und Mucosa-assoziierten Bakterien (Ruminococcus, Eubacterium, Fusobacterium)	(140)
- Veränderungen der intestinalen Schleimbarriere	(141)
- Probiotika verlängern Remission	(142)
experimentelle Belege	
- Darmflora zur Entzündungseinleitung in Mausmodellen benötigt	(83)
- Systemische Immundefekte können mit Darmentzündungen einhergehen	(84)
- Störungen des Signalweges auf bakterielle Bestandteile in Epithelzellen provozieren Entzündungen	(85)
- Störungen in der Abtötung von Bakterien induzieren Entzündungen	(86)

Tabelle 6 Erkenntnisse zu mikrobiellen Veränderungen im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung; schwarz = sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa feststellbar; rot = prädisponierend für Colitis ulcerosa. Die Tabelle wurde nach dem Vorbild des Reviews von R. Balfour Sartor (72) erstellt und modifiziert. Die Quellenangaben entsprechen den Originalquellen.

2.2.3.4 Funktionsstörungen der Schleimhautbarriere

Für die Barrierefunktion im Bereich der Mukosa nötige und im Zusammenhang mit Colitis ulcerosa oft veränderte Gene sind **ECM1**, **CDH1**, **HNF4 α** und **LAMB1**. Außerdem konnte eine enge Korrelation zwischen Veränderungen im **E-cadherin-Genlocus** bei Colitis ulcerosa und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen herausgearbeitet werden.

ECM1 - Dieses Gen codiert in unverändertem Zustand ein Glykoprotein (extrazelluläres Matrixprotein 1), welches im gesamten Intestinaltrakt vorgefunden werden kann und dessen Funktion zum einen die Interaktion mit der Basalmembran, die Inhibition der Matrix Metalloproteinase 9 (143) sowie eine starke Aktivierung von NF- κ B beinhaltet (144). In einigen kolorektalen Karzinomen konnte es nachgewiesen werden, so dass man es als einen Teil der molekularen Kaskade auf dem Weg zur Neoplasie ansieht, welche auf der Grundlage der chronischen, epithelialen Entzündungen im Rahmen einer Colitis ulcerosa aktiviert wird (145). Darüber hinaus verweist eine aktuelle Studie auf eine Assoziation zwischen Veränderungen im **ECM1**-Gen und der Entstehung von Mama-Karzinomen (146).

Störungen im Bereich der Zonae adhaerentes - Hintergrund ist die Codierung von E-Cadherin durch das Gen **CDH1**, welches ein transmembranes Glykoprotein als Hauptkomponente von Zonae adhaerentes darstellt. Es konnte ein Zusammenhang zwischen gestörter Regulation der E-Cadherin-Expression und der Entstehung einer Colitis ulcerosa hergestellt werden (147). Zusätzlich nutzen Bakterien wie *Bacteroides fragilis* (148) sowie Pilze (*Candida albicans*) (149) die

enzymatische Zerstörung der E-Cadherine zum Aufbrechen der Zellverbindung für ihr eigenes Eindringen aus.

Störungen im Bereich der epithelialen Barrierefunktion - Mit der Lokalisation auf Chromosom 20q13 stellt das Gen Hepatocyte nuclear factor-4 α einen Transkriptionsfaktor dar, welcher für die Entwicklung des Gastrointestinaltraktes im Säuger essentiell ist (150). Neben der Embryogenese beeinflusst ein Mangel an HNF4 α zum einen den Wnt-Signalweg, wodurch eine gesteigerte Zellproliferation im Bereich der Krypten des Dünndarms bewirkt wird. Zum anderen führt ein Mangel an HNF4 α zu einer Störung der epithelialen Zellarchitektur und einer fehlerhaften Zell-Zell-Verknüpfung durch den gestörten Transport von E-Cadherin und der gleichzeitigen Anreicherung davon im Zytoplasma (151).

Störungen im Bereich des basalen Zelladhäsionssystem - Laminine, beispielsweise codiert durch das Gen *LAMB1*, repräsentieren den vorherrschenden Anteil an Glykoproteinen in der Basalmembran und interagieren mit Integrinen. Auf diese Weise beeinflussen sie das Zell-Adhäsionssystem im Gastrointestinaltrakt und ermöglichen somit etwa die gerichtete Wanderung von weißen Blutzellen in Entzündungsherde (152). Proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IFN- γ steigern die Sekretion von Lamininen aus den Epithelzellen im Bereich der Krypten (153), wobei die gesteigerte Konzentration von Laminin im Serum mit der Krankheitsaktivität von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen korreliert (154). Gerade im Zusammenhang mit Colitis ulcerosa konnte ein Mangel an immunreaktiv produziertem Laminin im Bereich der Krypten festgestellt werden, wodurch die Beeinträchtigung einer regulären Barrierefunktion dargestellt wird (155). Weitere Untersuchungen zur Bedeutung dieser Beeinträchtigung stehen jedoch noch aus.

Störungen im Bereich der mucosalen Deckschicht - Bei einer Colitis ulcerosa findet sich eine deutliche Reduktion an Mucus produzierenden Becherzellen. Dieses hat Konsequenzen, da sich im Mucus unterschiedliche Defensine befinden, welche an der Abwehr von Darmpathogenen beteiligt sind (156). Außerdem findet man biochemische Veränderungen der Mucusschicht in Form von geringerer Sulfatierung und niedrigerer Schichtdicke vor (157). Als Ursache wird eine gestörte Differenzierung der Becherzellen angenommen (158). Die Folgen sind durch die gestörte Abwehrfunktion eine Übersiedlung der Mucosalschicht mit Bakterien und durch die Reduktion der Schichtdicke eine leichtere Penetration der

Mucosaschicht durch die Bakterien mit Auslösung der epithelialen Entzündungsreaktion.

2.2.3.5 Dysregulation des Immunsystems

Als eine Art Schlüssel für die intestinale Entzündung sieht man die Veränderungen im **IL-10** Signalweg an (159), weshalb sich hieraus auch vielversprechende neue therapeutische Ansätze ergeben könnten. IL-10 wird unter anderem von T-Helferzellen vom Typ 2 als antiinflammatorisches Zytokin freigesetzt, welches die proinflammatorische Zytokinproduktion von Th-1 Zellen (etwa TNF- α , IL-12) durch Aktivierung des STAT3-Signalweges supprimiert (160). An Hand von Mausmodellen wurde nachgewiesen, dass bei vorhandenen Darmbakterien IL-10 defiziente Mäuse Darmentzündungen entwickeln (161), welche nach dem Transfer von IL-10 produzierenden T-Zellen vermieden oder geheilt werden konnten (162). In einer aktuellen Publikation von Glocker et al. konnte die besondere Bedeutung des IL-10-Signalweges an Hand von Kindern mit Colitis ulcerosa zusammenfassend herausgearbeitet werden (163): Hierbei wurde über Genanalysen bei Kindern mit schweren Verläufen einer Colitis ulcerosa Mutationen im Bereich der codierenden Gene des IL-10 Rezeptors (IL10RA, IL10RB, IL10R2) festgestellt. Die Folge ist eine reduzierte STAT3-Phosphorylierung auf IL-10 Stimulation, sowie eine vermehrte Sekretion von TNF- α und anderen proinflammatorischen Zytokinen. Eine daraufhin bei dem am schlimmsten erkrankten Patienten durchgeführte allogene Stammzelltransplantation führte zur Einleitung einer Remission, welche bereits seit einem Jahr anhält. Desweiteren zeichnet sich Hoffnung für Patienten mit einer IL-10 Defizienz ohne Rezeptormutationen ab, da sich derzeit rekombinante IL-10 produzierende Bakterien vom *Lactococcus lactis*-Typ in einer Phase II Studie mit Colitis ulcerosa Patienten befinden (164).

Im Gegensatz zum Morbus Crohn findet man bei Colitis ulcerosa Patienten desweiteren niedrige Interferon-gamma und hohe **Interleuktin-13 (IL-13)** Werte. Ursächlich hierfür ist eine atypische Immunreaktion der T-Helferzellen vom Typ 2. Diese werden durch unklassische, IL-13 produzierende Natürliche Killerzellen mit zytotoxischem Potential für Epithelzellen induziert (165). Die Folgen sind neben der Entzündungsreaktion die Entwicklung einer entzündungsbasierten Fibrosereaktion (166). Dazu wird durch IL-13 das Protein „Transformierende Wachstumsfaktor-Beta vom Typ 1“ (TGF-beta(1)) in den Makrophagen gebildet, welches an-

schließlich über Membranrezeptoren mit Serin/Threonin-Kinase-Aktivität in Zusammenhang mit der Fibrosierung von Gewebe gebracht wird (167).

2.2.3.6 Zusammenfassung

Die Pathogenesemechanismen hinter der Colitis ulcerosa sind im Vergleich zu den Prozessen bei Morbus Crohn weniger genau geklärt. Dennoch lässt sich auch bei der Colitis ulcerosa von einer "Two-Hit-Hypothese" ausgehen, welche zum einen die Anfälligkeit in Form von Störungen der Abwehreigenschaften der Mucosa durch genetische als auch Umweltfaktoren und zum anderen den Befall mit mucosaschädigenden Erregern beinhaltet. Auf die Veränderungen der Darmflora kann des Weiteren eine unangepasste Immunantwort folgen, welche den Schweregrad der Erkrankung beeinflusst.

2.2.4 Diagnosestellung

Die Diagnostik der Colitis ulcerosa setzt sich aus der Anamnese, den klinischen Manifestationen, der Erfassung von laborchemischen und mikrobiologischen Parametern, sowie sonographischen und / oder endoskopischen und / oder radiologischen Untersuchungen zusammen.

Blutige Diarrhoen, eine erhöhte Stuhlfrequenz, vermehrter Stuhldrang mit anschließender Schmerzreduktion, nächtliche Defäkation, Tenesmen, das Gefühl der inkompletten Stuhlentleerung und Fieber stellen Leitsymptome der Colitis ulcerosa dar (168). Dabei lässt die Symptomatik jedoch nicht auf das zu erwartende Befallsmuster schließen. Mit der laborchemischen Untersuchung sollten die Entzündungsparameter (CRP oder BKS und Leukozyten), Blutbild (Hinweis auf Mangelerscheinungen über MCV und MCH) sowie Cholestasemarker (γ -GT, alkalische Phosphatase) zum rechtzeitigen Erkennen einer Primär Sklerosierenden Cholangitis als Komplikation der Colitis ulcerosa bestimmt werden. Ergänzend können weitere Werte wie Elektrolyte, Kreatinin, Harnstoff und Folsäure erhoben werden. Zur Bestimmung der inflammatorischen Aktivität werden bei Kindern zusätzlich die Erfassung des Calprotektins (169) oder des Lactoferrins (170) aus dem Faeces durch die S3-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen empfohlen. Eine Differenzierung zwischen infektiöser oder chronisch-entzündlicher Genese ist über diesen Parameter jedoch nicht möglich (171). Bei Patienten mit einer Colitis indeterminata kann des Weiteren die Bestimmung von pANCA (perinukleare antineutrophile zytoplasmatische Antikörper über Immunfluoreszenzverfahren), ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae Antikörper

über ELISA) und PAB (Pankreasantikörper über Immunfluoreszenz) hilfreich sein, da bei einem Teil der Patienten positive pANCA bei negativen ASCA die Diagnose einer Colitis ulcerosa wahrscheinlicher machen (172). Zur initialen Diagnosestellung sowie bei Verschlechterung sind mikrobiologische Untersuchungen mittels Stuhlkultur, Nachweis von Clostridium difficile Toxin A und CMV obligat. Ergänzend müssen bei Bedarf Parasiten und Amöben ausgeschlossen werden. Unabhängig vom Befallsmuster muss bei jedem Patienten eine Ileocoloskopie mit Biopsie-Entnahme aus dem terminalen Ileum und jedem Kolonsegment durchgeführt werden. Gerade makroskopisch unauffällige Darmabschnitte weisen histologisch noch Entzündungen auf, so dass endoskopisch die Krankheitsausdehnung häufig unterschätzt wird (173). Zur Diagnosesicherung ist desweiteren eine Kontrollendoskopie im Intervall notwendig. Als Technik sollten dabei hochauflösende Endoskope zum Einsatz kommen, um neoplastische Veränderungen rechtzeitig erkennen zu können. Hilfreich kann außerdem die Verwendung von hochauflösenden Ultraschalls sein, an Hand derer ein erfahrener Untersucher die Längsausdehnung einer Wandinfiltration oder das Auftreten von Komplikationen beurteilen kann.

2.2.5 Beurteilung der Entzündungsaktivität bei Colitis ulcerosa

Zur Einschätzung der Krankheitsaktivität wurden bereits viele unterschiedliche Indices entwickelt von denen sich bis heute auf Grund fraglicher Reliabilität und Validität keiner durchgesetzt hat (vgl. Aussage der S3-Leitlinien). Bekannt sind dennoch der historische, leicht zu erhebende Truelove-Index, welcher sich an Hand klinischer und laborchemischer Parameter berechnen lässt, sowie der umfangreichere Rachmilewitz-Index, welcher sich aus endoskopischen, klinischen und laborchemischen Parametern zusammensetzt. Zur Aktivitätsbeurteilung an Hand des histologischen Bildes gibt es derzeit noch kein einheitliches Schema. Das Schema der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz unterscheidet jedoch zwischen Remission, leichtgradiger, mittelgradiger und schwergradiger Entzündung. Dazu beurteilt sie beispielsweise Störungen in der Kryptenarchitektur, Kryptenatrophen, Muzinverluste im Randbereich von Ulcerationen, Infiltrationsstärke der Mucosa durch Lymphozyten und Plasmazellen sowie deren Verteilung.

2.2.6 Therapie

Die Therapie der Colitis ulcerosa richtet sich nach zwei Kriterien und beinhaltet stets die Einleitung und Erhaltung einer Remission. Das erste Kriterium stellt die Krankheitsausdehnung, das zweite die Krankheitsaktivität dar.

Distale Kolitiden mit leichter bis mittelgradiger Aktivität werden definiert als Kolitiden, welche das Rektum mit variabler Ausdehnung bis zur linken Kolonflexur betreffen. Auf Grund der topischen Erreichbarkeit werden diese Kolitiden bei leichter bis mittlerer Krankheitsaktivität auch bevorzugt topisch mittels eines Aminosalicylates behandelt. Die empfohlene Dosis beträgt dabei 2 - 2,4 g/d, da höhere Dosen keine verbesserte Wirkung aufweisen, geringere Dosen jedoch schlechter abschneiden (174). Budenosid, ein Steroid, welches einem hohen First Pass Effekt unterliegt, kann ebenfalls verwendet werden (175). Als Darreichungsformen kommen bei einer Proktitis Suppositorien ansonsten Klysmen oder Schäume in Frage.

Im Rahmen von **ausgedehnten Kolitiden** mit geringer bis mittelgradiger Entzündungsaktivität, welche über die linke Flexur hinausgehen, sollte primär eine orale Therapie erfolgen. Diese kann zusätzlich mit topischen Applikationen kombiniert werden. Auf Grund ihrer besseren Verträglichkeit sind dabei 5-Aminosalicylate dem klassischen Sulfasalzin als Mittel bei Gelenkbeteiligung zu bevorzugen. Insbesondere bei fehlendem Ansprechen oder längerdauernden Verlauf ist die Kombination mit oralen Steroiden trotz der Nebenwirkungen angebracht. Bei Rezidivneigung hat sich die Anwendung von Azathioprin als längerfristige Immunsuppression und Remissionserhaltung bewährt, wobei Azathioprin selbst zur Remissionseinleitung nicht geeignet ist (176).

Handelt es sich um **schwergradige oder fulminante Verläufe** muss oft eine intravenöse Steroidgabe initial erfolgen. Als Kombination erfolgt häufig die Zugabe von einem Antibiotikum wie Ciprofloxacin. In Rahmen von steroidrefraktären Verläufen kann zusätzlich der Einsatz von Cyclosporin oder Tacrolimus A erfolgen. Als äußerst effektive Therapeutika haben sich TNF- α -Hemmer (Infliximab, Adalimumab, Certolizumab) gezeigt (177).

Neben 5-Aminosalicylaten und Azathioprin als Standardtherapeutika der **Remissionserhaltung** hat sich erfolgreich eine große Bandbreite an Therapeutika aus der Komplementärmedizin etablieren können. Darunter fallen zum einen Probiotika wie Escherichia coli Bakterien vom Stamm Nissle (Mutaflor®) (178), Hefen (z.B. Perenterol®), Probiotika Mischungen (z.B. VSL#3®) und Bacillus subtilis Kulturen als auch die Applikation von Eiern des Schweinepeitschenwurmes Trichuris suis (179).

2.3 miRNA

2.3.1 Übersicht

Unter dem Begriff der microRNAs (Synonyme: miRNA oder auch miR) werden kurze, hoch konservierte, nicht kodierende RNAs mit einer Länge zwischen 21 und 25 nt zusammengefasst. Nachgewiesen werden konnten sie bereits in einer Vielzahl von Organismen, darunter auch Tieren und Pflanzen (180). Die Rolle dieser sehr kurzen RNAs liegt besonders in der Genregulation und ist speziell beim Gen-Silencing-Prozess zu finden. Die Genregulation erfolgt dabei beim Metazoa durch die Bindung der miRNAs an die 3' untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNA des entsprechenden Zielgens. Abhängig von der Komplementarität der Bindesequenz und der beteiligten Proteine erfolgt entweder eine Hemmung der Translation (181-184) oder der Abbau der entsprechenden mRNA des Zielgens durch Zerschneiden (185, 186). Damit übernehmen miRNAs eine wichtige Funktion nicht nur im Rahmen der Embryogenese (187), indem sie bei der Differenzierungen der einzelnen Organe und Gewebe mitwirken, sondern auch in der Regulation von unterschiedlichen physiologischen Prozessen innerhalb aller Zellen (188).

2.3.2 Erstbeschreibung, Klassifikation und Benennung

Victor Ambros und seine Kollegen, Rosalind C. Lee und Rhonda Feinbaum, beschrieben 1993 erstmals eine miRNA. Während ihrer Untersuchung der Funktionsweise des Gens *lin-4* zur Kontrolle von unterschiedlichen postembryotischen Entwicklungsprozessen im Nematoden *Caenorhabditis elegans* stellten sie fest, dass nicht wie erwartet ein Protein codierte wurde, sondern dass es bei gleichzeitiger Überexpression des *lin-4* Gens zu einem vorübergehenden Abfall der Konzentration an LIN-14-Protein kam. Dieses konnten sie durch die Identifizierung von zwei kurzen *lin-4* Transkripten in Form von 22 und 61 Nukleotide langen RNA-Molekülen erklären. Nach dem heutigen Kenntnisstand handelte es sich bei dem 61 Nukleotide langen RNA-Molekül um die unreife pre-miRNA und bei dem kürzeren 21 Nukleotide langen RNA-Molekül um die reife und aktive miRNA. Ausschließlich die kleinere RNA des *lin-4* Gens reguliert das Gen *lin-14*, indem es durch komplementäre antisense Basenpaarung an 7 Stellen der 3' untranslated Region (UTR) die *lin-14* mRNA bindet und ihre Translation hemmt (189). Die daraus entstandenen, die Translation supprimierenden Komplexe aus miRNA, den als Cofaktoren fungierenden Argonaut-Proteinen und 3'UTR eines Gens werden auch als RISC (RNA induced silencing Complex) zusammengefasst (190).

Das lin-4 Gen liegt auch in drei anderen Arten von Fadenwürmern streng konserviert vor (189) und durch die Entdeckung einer weiteren miRNA im Jahre 2000 in Form der let-7 (lethal-7) konnte gezeigt werden, dass es sich bei der Regulation über miRNAs nicht um ein seltenes Phänomen innerhalb der Fadenwürmer handelt. Bestätigend kam schließlich noch hinzu, dass die miRNA let-7 das Gen lin-41 und hbl-1 (lin-57) reguliert und es sich bei beiden Genen um evolutionär konservierte Gene handelte (191). Damit lag nahe, dass der Mechanismus der miRNA-Regulation auch auf andere Organismen angewendet werden könnte. In den folgenden Jahren konnte durch die Untersuchungen der Arbeitsgruppen Tuschel et al., Bartel et al. und Ambros et al. an Hand von drei unterschiedlichen Organismen (Drosophila (Taufliege), HeLa-Zellen (Mensch), Caenorhabditis elegans (Fadenwurm)) die Reichhaltigkeit an kleinen RNAs aufgezeigt werden, wodurch der Name miRNA im Jahre 2001 geprägt wurde (192, 193).

Durch die inzwischen rasante Entwicklung von neuartigen Methoden zur Sequenzierung (194, 195) und die zielgerichtete Analyse basierend auf computerassistierten Vorhersagemethoden (196, 197) konnten eine Vielzahl an kleinen RNAs identifiziert werden. Dabei definiert man heute die "small RNAs" im Eukaryonten an Hand des RNA induzierten "Silencing Pathway", der begrenzten Länge von 20 bis 30 nt und die Verknüpfung mit Proteinen aus der Argonaute (Ago)-Familie. Dabei kann die Ago-Familie zusätzlich in zwei Untergruppen bestehend aus der Ago-Untergruppe und der Piwi-Untergruppe aufgeteilt werden. Damit ergeben sich am Ende drei unterschiedliche Klassen von "small RNAs", welche im Genom von Eukaryonten codiert sind:

miRNAs: Diese werden aus lokalen Haarnadeln aufgrund von intramolekularer Basenpaarungen innerhalb eines Stranges von DNA, häufiger von RNA gebildet. Dieses geschieht unter Beteiligung der zwei Ribonukleasen vom Typ III Drosha und Dicer. Reife miRNAs mit einer Länge um die 22 nt werden anschließend durch Proteine der Ago-Untergruppe gebunden und reagieren auf diese Weise als post-transkriptionale Regulatoren.

piRNAs: Sie sind mit einer Länge von 24 - 31 nt die längsten der drei "small RNA"-Gruppierungen. Ihre Biogenese ist von der Ribonuklease Dicer unabhängig. Die Namensgebung erfolgte auf Grund der Interaktion der RNA-Moleküle mit einem Protein der Piwi-Untergruppe (Piwi-interacting RNAs, piRNAs). Die Proteine der Piwi-Untergruppe stellen dabei evolutionär hoch konservierte

und bisher auf Keimzellen begrenzte (198) Proteine dar, welche eine Funktion in der Regulation der Teilungsrate von Keimzellen besitzen (199). piRNAs konnten bisher ausschließlich in den spermatogenetischen Zellen des Hodens von Säugtieren festgestellt werden (200). Es besteht die These, dass sie an der Stilllegung von Transposons beteiligt sind, um auf diese Weise störende Einflüsse auf die Keimzellreifung zu reduzieren (201). Zusätzlich hat man im Rahmen von kürzlich durchgeführten Analysen die Annahme aufgestellt, dass miRNAs, welche mit dem Piwi-Protein interagieren, die Keimzellen induzieren können (202). Damit agieren piRNAs wie ein "Immunsystem für das Genom" (203).

Endo-siRNA: Die endogenous small interfering RNA (auch esiRNA genannt) entstehen aus langen Doppelstrang-RNAs (dsRNAs), welche ausschließlich durch die Ribonuklease Dicer geschnitten werden. Die Biogenese ist jedoch noch unklar und basiert auf zwei unterschiedlichen Thesen: Zum einen der sporadisch auftretenden Antisenstranskription gegenüber der These in Form der Konvertierung von mRNA eines Transposons in dsRNA (203). Fest steht jedoch, dass das Ergebnis in Form der endo-RNA mit 21 nt etwas kürzer als eine miRNA ist. Ähnlich wie bei den miRNAs interagieren aber auch diese mit Proteinen der Ago-Untergruppe. Die Funktion entspricht einer Stilllegung von Transposons und ist somit "als Immunsystem des Genoms" für somatische Zellen zu sehen (203). Zur Identifizierung, Verifizierung und Benennung der Vielzahl an neu identifizierten kleine RNAs, einigten sich daher drei Arbeitsgruppen im Jahre 2003 auf zwei Expressions- und drei Entstehungskriterien (180).

Die Benennung einer miRNA erfolgt über das Präfix „miR“ und einer einzigartigen Identifikationsnummer (Beispiel: miR-1, miR-2, etc...). Gene, welche die miRNA codieren, erhalten denselben Präfix, wobei dieser nun gemäß den Vorgaben des jeweiligen Organismus großgeschrieben, gekoppelt oder kursiv geschrieben werden kann (Beispiel: *mir-1* als miRNA in der Taufliege/Fadenwurm/Mensch, oder MIR156 als miRNA im Reis). Am Beispiel wurde auch deutlich, dass in ihrer Sequenz nahezu gleiche miRNAs unabhängig vom Lebewesen die gleiche Identifikationsnummer tragen können. Nahezu (Beispiel: Drosophila miR-13a und miR-13b) oder gar identische (Beispiel: Drosophila miR-6-1 und miR-6-2) miRNAs innerhalb einer Spezies erhalten ebenfalls die gleiche Nummer, werden jedoch durch einen Buchstaben oder einer Zahl als Suffix von einander differenziert (192). Alle miRNAs wurden in der microRNA Database miRBase des Wellcome Trust Sanger Insti-

tutes erfasst, welche nun durch die Faculty of Life Sciences an der University of Manchester fortgeführt und gepflegt wird.

2.3.3 Lokalisation und Entstehungsmechanismen der miRNAs

Über die Hälfte der miRNAs befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen miRNAs. Diese geclusterten miRNAs werden als "poly-cistronic" transkribiert (204). Jedoch konnte an Hand von einzelnen Fällen bereits aufgezeigt werden, dass es auch miRNAs mit ihrem eigenen Promotor gibt, welche auch als "mono-cistronic" transkribiert werden (204). Außerdem können die miRNAs an Hand ihrer Lokalisation innerhalb des Gens in vier Untergruppen unterteilt werden, was in *Abbildung 7* veranschaulichend zusammengefasst wird:

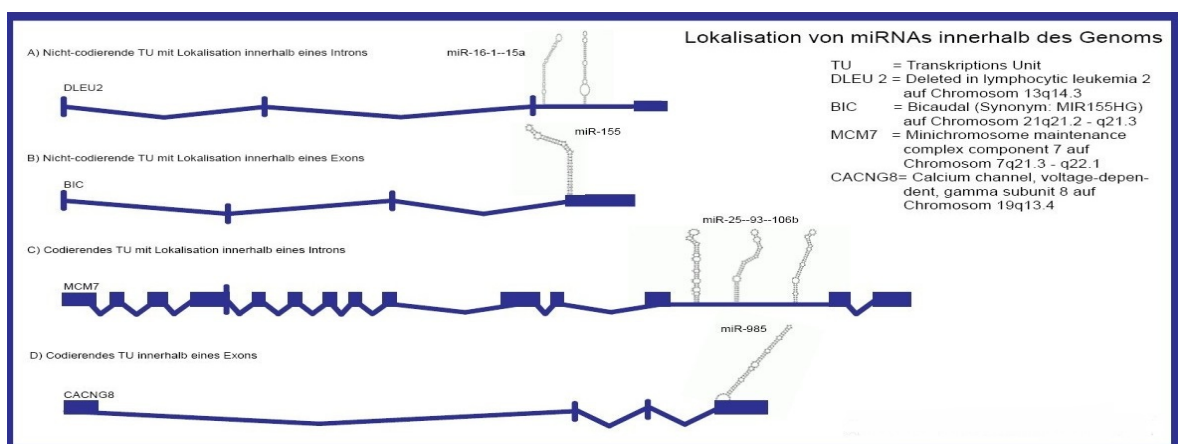


Abbildung 7 Unterschiedliche Lokalisationen der miRNAs innerhalb des menschlichen Genoms; Abbildung modifiziert nach Darstellungen aus Nature Reviews „Molecular Cell Biology“ und ergänzt mit Abbildungen der einzelnen miRNAs der Firma Qiagen

Der Entwicklungsprozess einer miRNA von seinem Gen zu einer reifen und ausführenden miRNA gliedert sich in fünf Einzelschritte (vgl. *Abbildung 8*):

Transkription: Die meisten miRNAs werden über eine Typ II RNA Polymerase (Pol II) transkribiert (205), an deren 5'-Ende eine 7-methyl-guanylierte Kappenstruktur (m7G-cap) und an deren 3'-Ende ein Poly-A-Schwanz (AAAA) angefügt wird. Jedoch wurde für einzelne miRNAs auch bereits von einer Transkription durch die RNA Polymerase III berichtet (206). Das Ergebnis bleibt jeweils in Form einer pri-miRNA gleich, welche mehrere Kilobasen lang und Haarnadel-förmig konfiguriert ist. Dabei können mehrere Schleifen in dieser vorhanden sein. Die Regulation der Transkription erfolgt über eine Reihe von RNA-Polymerase II abhängigen Transkriptionsfaktoren, worunter zum Beispiel STAT3, HIF, p53 oder E2F3 zu nennen sind (207).

Processing: miRNAs, welche aus einem Exon entstammen, werden nun von einem Microprocessor innerhalb des Zellkerns übernommen und prozessiert.

Der Microprocessor setzt sich dabei aus der Typ III RNase Drosha (208) und dem Cofactor DGCR8 (im Menschen) zusammen (209, 210). Dabei wird ein Großteil des basalen Überhangs inklusive der m7G-Kappenstruktur und des Poly-A-Schwanzes entfernt, wodurch die pre-miRNA entsteht (204). Alternativ zu diesem Weg, gibt es jedoch noch zwei weitere Pathways, welche speziell für in einem Intron lokalisierte miRNAs gelten:

Im Microprocessor-Pathway (211, 212) bildet der bereits beschriebene Microprocessor, bestehend aus Drosha und dem Cofaktor DGCR8, mit der Polymerase II und einem Spliceosom eine Einheit. Mit der Aktivierung des Mikroprocessors wird somit noch im Prozess der Transkription die pri-miRNA gebildet, wobei ihre Überhänge dem Spliceosom erhalten bleiben.

Der Mirtron-Pathway (213, 214) wird nur für die Herstellung von vereinzelt miRNAs innerhalb von kurzen Introns in Anspruch genommen, wobei die Typ III RNase Drosha dabei umgangen wird. Im Rahmen des Splicens wird eine lassoförmige, miRNA-ähnliche RNA gebildet, welches auf noch unbekanntem Wege direkt zu einer pre-miRNA rekonfiguriert werden kann. Kommt es jedoch im Rahmen des Rekonfigurationsprozesses zur Bildung eines Überhangs an RNA, so muss dieser Überhang in einem weiteren Schritt abgeschnitten ("getrimmt") werden, um letzten Endes eine pre-miRNA auszubilden.

Transport: Der Transport der gebildeten pre-miRNAs aus dem Nucleus in das Zytoplasma erfolgt über das Protein Exportin-5 (215) mit dem Cofaktor Ran (216), welcher durch die Hydrolyse von dem an ihm gebundenen Guadenosin-tri-Phosphat die dafür notwendige Energie liefert.

Reifung: Im Zytoplasma angekommen, erfolgt eine weitere enzymatische Hydrolyse durch die Ribonuklease Dicer (217), welche ebenfalls zu den Typ III RNasen gehört. Dabei wird die Haarnadelstruktur der pre-miRNA aufgelöst und das von der RNase Drosha nicht beschnittene Ende gekürzt. Obwohl Dicer unabhängig von Cofactoren arbeiten kann, bildet es einen Komplex mit verschiedenen Cofaktoren wie Ago 1-4 (218), TRBP (219) und / oder PACT (220) aus.

Beladung des Ago-Proteins: Die Bedeutung der Cofaktoren liegt in der Ausbildung der regulierenden Endstufe in der miRNA-Genese: dem „induced silencing Complex“ (miRISC) (221). Nachdem durch die Helicase A (222) die doppelsträngige miRNA entwunden wurde, wird eine Strangseite in ein Ago-Protein der Klasse 1-4 inkorporiert. Auf diese Weise wird für die meisten miRNAs auch

eine deutlich verlängerte Halbwertszeit von über 12 Stunden erreicht (223). Die zu inkorporierende Stranghälfte wird an Hand der thermodynamischen Stabilität seiner Enden gewählt (224). Die andere Stranghälfte wird über derzeit noch unbekannte Nucleasen abgebaut. Im Folgenden kommt es zur Vervollständigung des miRISC durch Assoziation von unterschiedlichen Faktoren, wie etwa eIF6 an TRBP und Gemin 3 (181). Die Wirkung der miRNAs wird über die inkomplette Basenpaarung des inkorporierten miRNA-Führungstranges mit der Ziel-mRNA entfaltet. Die Sequenzspezifität ergibt sich dabei aus der "Seed Sequence", welche durch die Nukleotide 2-8 am 5'-Ende dargestellt wird (225). Daraus ergibt sich auch, dass eine miRNA dazu befähigt ist, auf mehrere mRNAs mit der entsprechenden 3'-untranslated Region (UTR) einzuwirken. Computerbasierte Analysen legen dabei nahe, dass circa 30% der proteinkodierenden Gene im Menschen auf diese Weise durch miRNAs reguliert werden könnten (226).

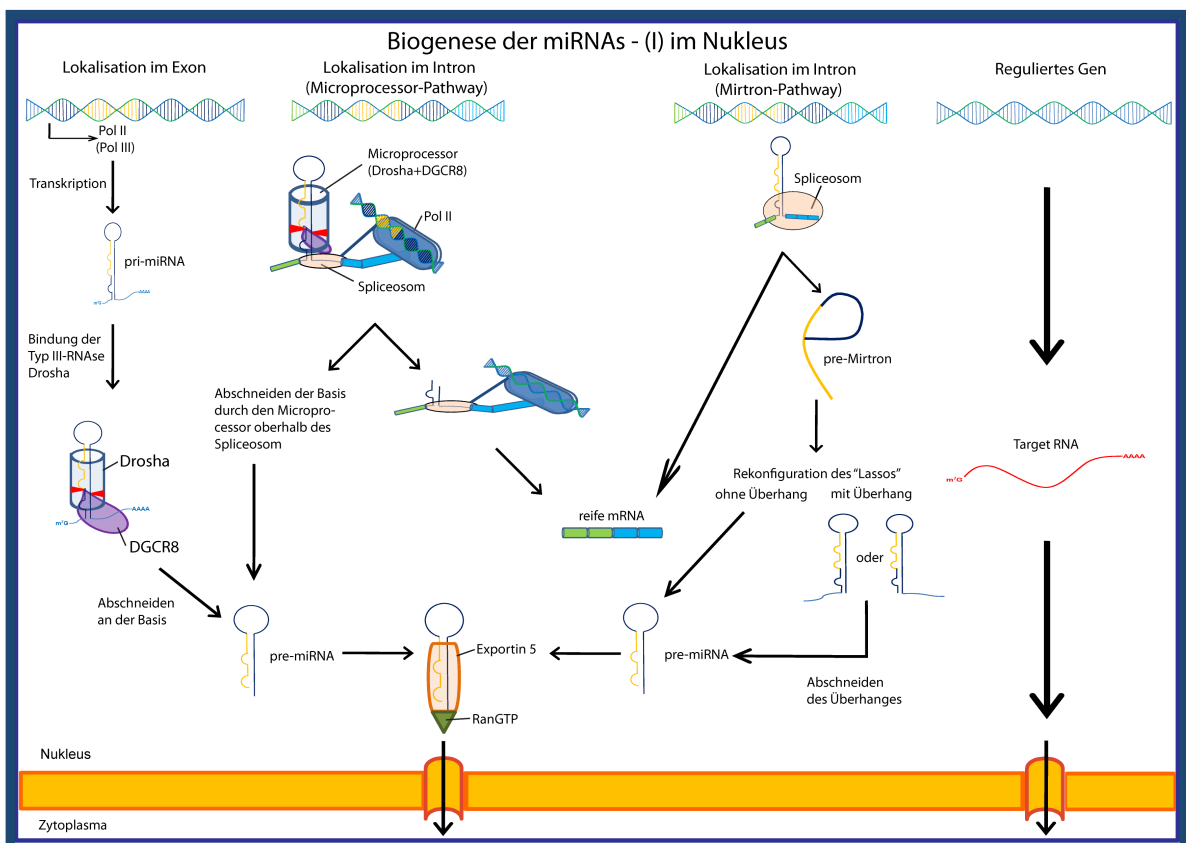


Abbildung 8 Biogenese der miRNAs im Nukleus; Abbildung entstand aus unterschiedlichen Veröffentlichungen, welche im Text näher beschrieben werden.

2.3.4 Wirkungsweise

Über die Ausbildung des miRISC-Komplexes haben miRNAs unterschiedliche Möglichkeiten, auf die Proteinsynthese einzuwirken (227). Dabei ist bereits mehrfach belegt, dass sie entweder an der Induktion zum Abbau der Ziel-mRNA beteiligt sind, oder die Translation dieser hemmen können. Außerdem kann die Ziel-mRNA über die miRNAs in Lagerkompartimente, wie etwa P-Körperchen, überführt werden. Der Abbau der Ziel-mRNA über Deadenylierung, Entfernung der Cap-Struktur und Abbau von 5'→3'-Ende über eine Exonuklease gilt dabei als gesichert (185). Im Gegensatz dazu fehlt auf Grund unterschiedlicher teilweise widersprüchlicher Ergebnisse von unterschiedlichen Forschungsgruppen eine Einigung, ob miRNAs die Translation auf Höhe der Initiation, während der Translation oder zu beiden Zeitpunkten hemmen können (vgl. hierzu Reviews (227, 228)). In *Abbildung 9* werden alle, bisher experimentell identifizierten Möglichkeiten der hemmenden mRNA-Beeinflussung zusammengefasst.

Abbildung 9-I: Deadenylierung und Abbau: Für diesen Prozess wird neben der miRNA das Ago-Protein und GW182 (Synonym: TRC6a; trinucleotide repeat containing 6 protein) als Bestandteile des miRISC benötigt. Durch das Protein GW182 wird ein Deadenylase-Komplex akquiriert (CCR4-NOT1), welcher den Poly(A)-Schwanz der mRNA abbaut (185). Im Anschluss wird die mRNA entweder über die Exosomen und ihre Cofaktoren am 3'-Ende beginnend zerstört, oder es erfolgt die Entfernung der m⁷G-Kappe am 5'-Ende durch den DCP1-DCP2 decapping complex und der 5'→3'-Abbau durch die Exonuklease Xrn1 (186).

Eine weitere Wirkungsweise stellt die **Hemmung der Initiation der Translation** dar (*Abbildung 9-II*): Dieses kann über zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Zum einen existiert im Ago2-Protein des miRISC ein "cap-binding motif" (MC), welches dem "translation initiation factor" eIF4E ähnlich ist. Die Folge ist die direkte Bindung und Blockade der mRNA-Kappen-Struktur mit Ago2 (182). Der andere Mechanismus ist die Blockade der Vereinigung der 80S-Untereinheit mit der 60S-Untereinheit der Ribosomen. Diese Blockade erfolgt über eIF6 (eukaryotic translation initiation factor 6), welches an TRBP des miRISC bindet (219).

Der dritte Weg stellt die **Hemmung der Translation nach ihrem Beginn** dar (*Abbildung 9-III*): Dieser Weg ist noch weitestgehend unerforscht. Aus polysomalen Sedimentationsanalysen (229), der Beobachtung, dass unterschiedliche miRNAs mit polysomalen Einheiten assoziiert vorlagen (230) und aus der Feststel-

lung, dass die Hemmung auch dann auftritt, wenn die Translation auf Grund von "internal ribosome entry sites" (IRES) unabhängig von Initiationsfaktoren auftritt (183), wurde darauf geschlossen, dass die Translation nach ihrem Beginn angehalten und die Fertigstellung des Proteins verhindert wird. Als mögliche Erklärungsansätze dafür lassen sich ein vorzeitiger Ribosomen-Abgang auf Grund der Blockade der Polypeptidketten-Entstehung (183) als auch die Rekrutierung von proteolytischen Enzymen zum vorzeitigen Abbau der entstehenden Polypeptidkette finden (184).

Lokalisationsanalysen haben gezeigt, dass die in der Translation supprimierte mRNA letzten Endes zum Abbau sowie zur Aufbewahrung in Zellkompartimente wie P-Körperchen (Synonym: GW- oder P-bodies, Processing bodies) (231), Stressgranulas (232), Endosomen und endosomale Kompartimente mit einem multivesikulären Aussehen (MVBs, multivesicular bodies) (233) überführt werden können.

Entgegen der primären Funktion der Translationshemmung können miRNAs unter bestimmten Umständen die **Translation von mRNAs auch fördern**. So konnte gezeigt werden, dass miRNAs in proliferierenden Zellen die Translation hemmt, in Zellen, welche sich in der G0- oder in der G1-Phase des Zellzyklus befinden, diese jedoch steigert (234). Auch als Antwort auf zellulären Stress oder Mangelversorgung erfolgt eine Steigerung der Translation durch die miRNAs (235), indem sie an die 5'-UTR von Ribosomen- und Translationsfaktoren-codierenden mRNAs binden. Eine Bindung von miRNAs an die 3'-UTR hat jedoch wiederum eine Hemmung der Translation zur Folge.

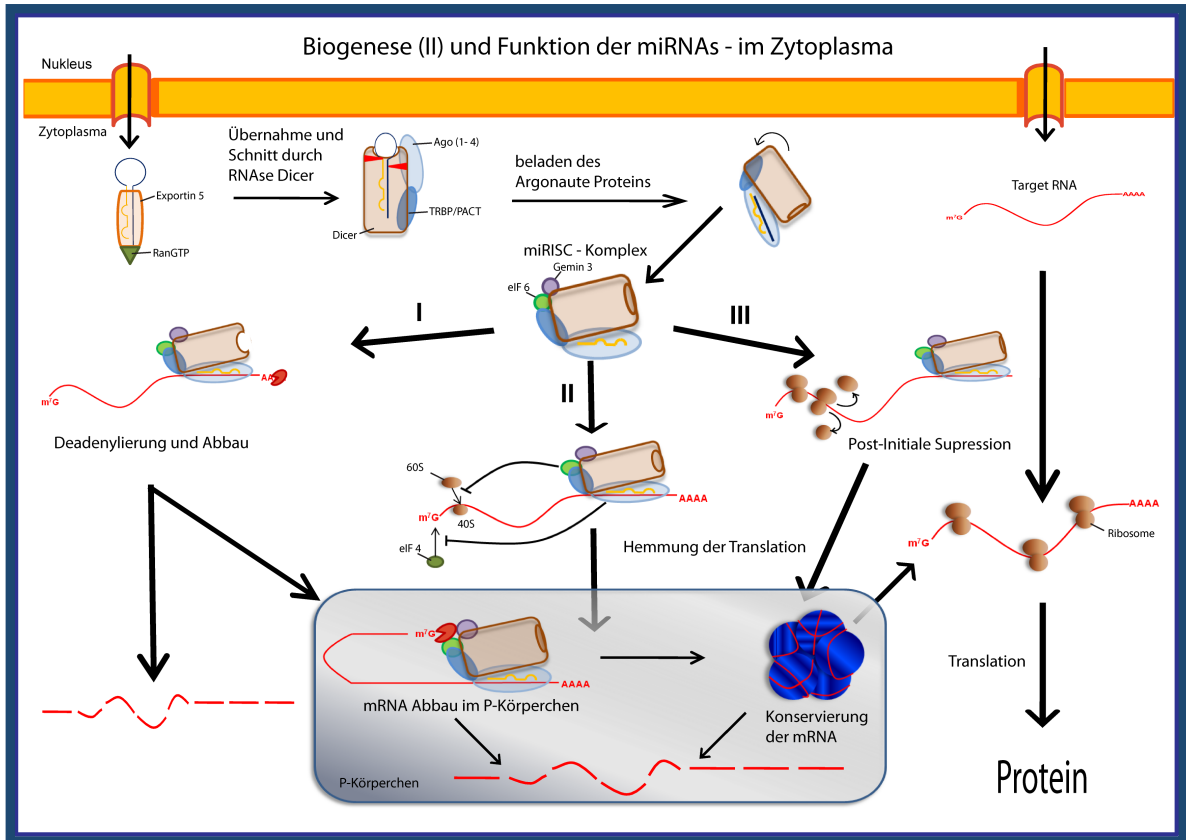


Abbildung 9 Biogenese (II) und Funktion der miRNAs; dargestellt werden die im Text beschriebenen drei unterschiedlichen Wege (9-I, 9-II, 9-III) der miRNA-Funktion.

2.3.5 Klinische Relevanz und Visionen

Durch Expressionsanalysen in unterschiedlichen Geweben konnten bereits Veränderungen in einer Vielzahl von pathologischen Prozessen nachgewiesen werden. Dadurch zeigte sich, dass die Fehlregulation von miRNAs an der Pathologie von Tumoren (236) beteiligt ist. Auch Viren nutzen die miRNAs ihrer Wirte, um damit ihre eigene Virulenz durch Verbesserung der Produktion und der mRNA Stabilität zu ermöglichen (237). So konnte bewiesen werden, dass die miR-122 bei der chronischen Hepatitis C von entscheidender Bedeutung ist, um die Vermehrung des Hepatitis C Virus zu ermöglichen (238) und es konnten neue therapeutische Strategien erarbeitet werden, welche schon bald im klinischen Alltag von besonderer Bedeutung sein könnten: In der Veröffentlichung von Robert Lanford et al. im Januar 2010 (239) wurden etwa Schimpansen, welche an einer chronischen Hepatitis C-Infektion litten, mit LNAs (locked nucleic acids) behandelt, welche komplementär zur miR-122 wirkten und diese blockierten. LNAs stellen dabei verbrückte Nucleinsäuren dar, deren Zuckeranteil chemisch modifiziert wurde und stabiler als normale Nucleinsäuren sind. Auf Grund dieser Therapie konnte gezeigt werden, dass die Replikation des Hepatitis C-Virus lang anhaltend supprimiert werden konnte und die Virulenz deutlich abnahm. Dabei traten weder uner-

wünschten Reaktionen noch Resistenzen auf. Auch histologische Veränderungen der Leber auf Grund der Infektion konnten unter der Therapie deutlich reduziert werden.

miRNAs zeigen des weiteren einzigartige Expressionsprofile in Zellen des angeborenen wie auch erworbenen Immunsystems auf und nehmen dabei eine grundlegende Rolle in der Regulation, sowohl der Zell-Entwicklung als auch der Funktion, ein (240, 241). Sie tragen entscheidend dazu bei, die Entstehung einer Autoimmunität zu verhindern, indem sie:

- Die Genexpression etwa von "inducible T cell co-stimulatores (ICOS)" regulieren, welche in enger Bandbreite für eine Aufrechterhaltung der adäquaten T-Zell-Antwort benötigt werden (242).
- Die Selektion von T-Zellen im Thymusgewebe überwachen, indem sie auf die Bindungsstärke der T-Zellen mit den MHC-Molekülen bei der positiven wie negativen Selektion einwirken (243).
- Die Funktion von regulierenden T-Zellen (T_{reg}) aufrechterhalten (244).
- Die Immunantwort und Entzündungsaktivität über einen negativen Feedback-Mechanismus drosseln (245).

Ein Zusammenhang von das Immunsystem einbindenden Erkrankungen - wie etwa Autoimmunerkrankungen (246), worunter auch die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen fallen (247) - konnte mit der abweichenden Expression von miRNAs aufgezeigt werden.

Zusammenfassend liefert die Untersuchung des Expressionsverhaltens von miRNAs in Abhängigkeit des Gewebes und der Erkrankung, die Grundlage zu einem tiefergehenden Verständnis der zu Grunde liegenden Pathogenesemechanismen, mit dem Ziel, spezifischere therapeutischen Maßnahmen bei viralen (248), bakteriellen (249), karzinogenen oder autoimmunen Erkrankungsprozessen zu entwickeln (250).

3 Material und Methodik

Das Patientenkollektiv wurde in den Jahren 2008/2009 im Rahmen einer medizinisch indizierten endoskopischen Untersuchung an der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Peter R. Galle) unter Wahrung der Vorgaben des lokalen Ethikkomitees erfasst. Die experimentellen Auswertungen erfolgten in den Jahren 2008 bis 2009 am Institut für Molekularmedizin der Universitätsmedizin Mainz (Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Markus F. Neurath).

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller	
MacBook Pro	Apple	USA
Medion MAM2150 Notebook PC	Medion,	Deutschland
PCR	PeqLab;	Deutschland
Echtzeit-PCR (iCycler)	BioRad; München	Deutschland
Spektrophotometer (ND-1000 UV/Vis)	NanoDrop;	USA
Tissue Lyser (MM300)	Retsch; Haan	Deutschland

Tabelle 7 Geräte

3.1.2 Software

Programm	Hersteller	
Adobe Illustrator CS 3 (V 13.0.0)	Adobe Systems Inc.;	USA
Cytoscape (V 2.8.2) for Mac	Open source	USA
ClueGO (V 1.4), plug-in for Mac	Open source	USA
EndNote 5X for Mac	The Thompson Corporation	USA
Excel 2011 for Mac	Microsoft; Unterschleißheim	Deutschland
SPSS 12.0 für Windows	SPSS Inc.; Chicago	USA
SQLight	Hawaci; Charlotte, NC28269	USA
Word 2011 for Mac	Microsoft; Unterschleißheim	Deutschland

Tabelle 8 Software

3.1.3 Datenbanken

Datenbank	Internet-Adresse
Gene Ontology	http://www.geneontology.org/
miRBase: the microRNA database	http://www.mirbase.org/
Protein Knowledgebase UniProtKB	http://www.uniprot.org/
PubMed Medline	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?otool=hebis

Tabelle 9 Datenbanken

3.1.4 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalie	Hersteller	
Aqua Dest	Braun; Melsungen	Deutschland
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe	Deutschland
Ethanol unvergällt	Carl Roth; Karlsruhe	Deutschland
Ethylalkohol vergällt	Martin & Werner Mundo OHG; Kostheim	Deutschland
Fluorescein Calibration Dye 1mM in DMSO	BioRad;	
Flüssigstickstoff	Linde AG; Mainz-Kostheim	Deutschland
QIAzol Lysis Reagent 50 mL	QIAGEN; Maryland,	USA
RNAlater RNA Stabilisation Reagent	QIAGEN; Hilden	Deutschland
RNAse free Water	QIAGEN GmbH; Hilden	Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth; Karlsruhe	Deutschland

Tabelle 10 Chemikalien und Biochemikalien

3.1.5 Puffer

Puffer	Hersteller	
Buffer RPE	QIAGEN GmbH; Hilden	Deutschland
Buffer RWT	QIAGEN GmbH; Hilden	Deutschland
TRIS Buffer	Carl Roth; Karlsruhe	Deutschland

Tabelle 11 Puffer

3.1.6 Enzyme

Enzym	Hersteller	
DNase free	QIAGEN GmbH; Hilden	Deutschland

Tabelle 12 Enzyme

3.1.7 Analyse-Kits

Kit	Hersteller	
miRNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN; Hilden	Deutschland
miScript Reverse Transcriptionase Kit (50)	QIAGEN; Hilden	Deutschland
miScript SYBR Green PCR Kit	QIAGEN; Hilden	Deutschland
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich; Saint Louis	USA

Tabelle 13 Analyse-Kits

3.1.8 Primer

miRNA-Primer	Sequenz	Chromosom
led-7d_2	5'AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	
miR-15a_1	5'UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	13q14.2
miR-18a_1	5'UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	13q31.3
miR-19a_1	5'UGUGCAAUUCU AUGCAAACUGA	13q31.3
miR-19b_1	5'UGUGCAAUUC AUGCAAACUGA	13q31.3
miR-22_1	5'AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	17p13.3
miR-30e_1	5'UGUAAACAUCUUGACUGGAAG	1p34.2
miR-101_3	5'UACAGUACUGUGAUAAACUGAA	1p31.3
miR-141_1	5'UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG	12p13.31
miR-185_1	5'UGGAGAGAAAGGCAGUCCUGA	22q11.21
miR-374b_1	5'AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	Xq13.2
miR-424_1	5'CAGCAGCAAUUC AUGUUUUGAA	Xq26.3
RNU6B_2	1'CTGCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCC ATATTTTT	10p13

Tabelle 14 Primer; alle Primer stammen von der Firma QIAGEN (Hilden). Die RNU-6b stellt dabei den Primer für das Referenzgen dar

3.2 Methodik

3.2.1 Datenerfassung

Zur einheitlichen Datenerfassung wurde ein standardisierter Erhebungsbogen in Form einer Excel-Tabelle (Version Excel 2007) erstellt. Im Rahmen dieses Erhebungsbogens wurden anonymisiert Daten zu Geschlecht, Alter, Art der Erkrankung, Erstdiagnose der Erkrankung, Therapie zum Zeitpunkt der Untersuchung, Lokalisation des gewonnenen Biopsiematerials sowie die Aktivität (gesund versus entzündet) registriert. Die Therapien wurden dabei in mehrere Kategorien gegliedert. Diese setzten sich folgendermaßen zusammen (*Tabelle 15*):

Therapeutikaklassen	Wirkstoffe
Salazine	Mesalazin, Sulfasalazin
Antibiotika	Metronidazol, Ciprofloxacin
Kortikosteroide	6-Methylprednisolon, Prednisolon, Budesonid
Immunmodulatoren	Methotrexat, Ciclosporin A, Azathioprin, 6-Mercaptopurin
Biologics	Tacrolimus, Infliximab, Natalizumab

Tabelle 15 Zuordnung der erfassten Wirkstoffe in Therapeutikaklassen

Angaben zur aktuellen Therapie sowie zur Erstdiagnose konnten jedoch nicht immer nachvollzogen werden. Der Schweregrad der Entzündung wurde sowohl an Hand eines endoskopischen Gradings also auch an Hand des in Mainz bestehenden histologischen Gradings gemäß der Angaben der Pathologen erfasst. Das pathologische Grading basiert auf den hauseigenen Standards. Berücksichtigt

wurden mehrere Parameter, darunter unter anderem der Schweregrad der Epithelinvasion und die Anzahl an segmentkernigen Granulozyten. Die Angaben zur Art der Erkrankung und der Aktivität des Gewebes wurden mit dem histologischen Ergebnis verglichen und gemäß diesem korrigiert. Die Daten aus dem Erhebungsbogen wurden in das Statistikprogramm SPSS (Version 12.0) überführt, neu verschlüsselt und ausgewertet.

3.2.2 Biopsiematerial

Alle Biopsien stammen aus dem Bereich zwischen dem terminalen Ileum und dem Rektum. Die Materialentnahme war dabei jeweils klinisch notwendig und erfolgte bei bestehender Indikation gemäß der aktuellen Empfehlung als Stufenbiopsie. Die Entnahmeorte für die Biopsien wurden abhängig vom Untersucher und vom klinischen Bild während der endoskopischen Untersuchung gewählt. Alle Biopsien wurden stets an die Pathologie weitergeleitet, wobei abhängig vom endoskopischen Entzündungsbild und ihrer Lokalisation bei einigen Biopsien zuvor ein kleiner Gewebsanteil für die Analyse der Expressionsdaten abgetrennt wurde. Besondere Präferenz der analysierten Biopsien galt dem Rektum als Kontrolle für die Colitis ulcerosa, dem Colon transversum als „Mitte des Darmes“, sowie dem terminalen Ileum als Kontrolle der Morbus Crohn-Gruppe. Zum Vergleich des Expressionsverhaltens wurden, insofern vorhanden, sowohl Biopsieanteile aus den entzündeten Areal als auch aus den nicht-entzündlichen Areal analysiert.

3.2.3 Konservierung, Transport und Lagerung des Gewebematerials

Alle Biopsieanteile wurden sofort nach Extraktion in vorbereitete 2 mL *CryoTubes Vials* (Nunc; Roskilde, Dänemark) mit jeweils 2 mL *RNAlater Stabilisation Reagent* (QIAGEN; Hilden) überführt. Auf diese Weise konnten die Biopsien bei Raumtemperatur (15-25°C) für bis zu 7 Tage konserviert werden, ohne Gefahr einer qualitativen und quantitativen RNA Beeinträchtigung. Für gewöhnlich wurden alle Biopsieanteile noch am selben Tag weiterverarbeitet. Dazu wurden sie bei ausreichender Gewebegröße in zwei Teile geteilt. Der erste Anteil wurde gemäß dem Protokoll des *miRNAeasy Mini Handbook* der Firma QIAGEN (Hilden) lysiert und die TotalRNA isoliert (siehe unten). Der zweite Anteil wurde über Nacht in dem *RNAlater Stabilisation Reagent* bei 2-8°C inkubiert. Die Überführung in ein neues *CryoTubes Vials* ohne *RNAlater Stabilisation Reagent* erfolgte am nächsten Tag. Diese Probe wurde bei -80°C eingefroren.

3.2.4 Experimentelles Modell

3.2.4.1 Allgemeine Anmerkungen zum Umgang mit RNA

Ribonukleasen sind sehr stabile und aktive Enzyme, welche unabhängig von Cofaktoren arbeiten können und RNA zersetzen. Dabei reichen bereits kleinste Mengen dieses ubiquitär vorkommenden Enzymes aus, um RNA abzubauen. Ein weiteres Problem stellen Kontaminationen etwa durch Proteine oder DNA dar, welche im Rahmen einer RealTime-PCR-Analyse zu verfälschten Ergebnissen führen.

Um einem vorzeitigen Abbau entgegenzuwirken und Kontaminationen bestmöglich zu vermeiden, sind besondere Anforderungen an den Arbeitsplatz notwendig, welche folgendermaßen umgesetzt wurden:

- Schaffen eines Rein-Arbeitsplatzes unter einer Flow durch ausgiebige Desinfektion und Behandlung mit DNaseFree-Solution, welche laut den Angaben des Herstellers ebenfalls RNAsen deaktiviert.
- Vor Gebrauch Behandlung der Pipetten und der benutzten Gebrauchsgüter mit DNaseFree-Solution.
- Verwendung von RNase freien Lösungen und Kits (alle verwendeten Lösungen der Firma QIAGEN sind gemäß dem Hersteller RNase frei).
- Ausspülen von Gefäßen mit Chloroform zur Deaktivierung von RNase.
- Tragen von Handschuhen zur Vermeidung von Kontaminationen durch die Haut, verbunden mit einem Wechsel von diesen pro Arbeitsschritt.
- Pipettieren der Reaktionssätze auf Eis.
- Öffnung der Reaktionsgefäße nur bei Bedarf mit sofortigem Verschluss danach.
- Während der TotalRNA-Isolation zusätzliche Durchführung einer DNase-Digestion.

Die Effektivität dieser Maßnahmen konnte an Hand einer spektrophotometrischen Analyse der isolierten TotalRNA mit Hilfe des Spektrophotometers ND-1000 UV/Vis (Firma: NanoDrop; US) wie im Kapitel 3.2.4.3. beschrieben untersucht werden.

3.2.4.2 Präparationsverfahren zur Gewinnung der TotalRNA

Die Isolation der TotalRNA und somit auch der miRNA erfolgte gemäß des Protokolls des Herstellers in 3 Phasen mit insgesamt 27 Einzelschritten (*miRNeasy Mini Handbook, QIAGEN; Hilden*). Zusätzlich wurde das Protokoll durch einen DNA-

Verdau mit dem Enzym DNase bei der Hälfte der Proben ergänzt. Der DNA-Verdau wurde im weiteren Verlauf unterlassen, da es dadurch zu keiner Qualitätssteigerung der TotalRNA-Isolation kam. Das Grundprinzip der TotalRNA Isolation beruht dabei auf einer kombinierten phenol/guanidin-thiozyanat basierten Zelllyse (*Qiazol Lysis Reagent, QIAGEN; Hilden*) sowie einer speziellen Silikat-Filtermembran (*RNeasy mini spin column, QIAGEN; Hilden*). Um eine Überladung und somit Verstopfung der Silikatmembran zu vermeiden, wurden jeweils annähernd gleich große Biopsiemengen von rund 10 mg Gewebe verwendet.

Das Ziel der ersten Phase stellte die Auflösung des Zellverbandes sowie der Zellmembranen dar, so dass am Ende eine wässrige Lösung aus Zellbestandteilen, Proteinen, DNA und RNA resultierte. Dazu wurden jeweils ca. 10 mg Gewebe, 700 µL *Qiazol Lysis Reagent*, sowie eine 500 mg schwere Metallkugel (QIAGEN; Hilden) in ein 2 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf; Hamburg) gegeben. Die eigentliche Lyse erfolgte mit dem Tissue Lyser MM300 (Retsch; Haan) in zwei Durchläufen bei 2 Minuten à 20 Hz.

In der zweiten Phase musste nun die TotalRNA in dem Homogenat von DNA und Proteinen getrennt werden. Dazu wurde das Homogenat durch Zugabe von 140 µL Chloroform, kräftiges Schütteln für 15 Sekunden, ruhen lassen (3 Minuten bei Raumtemperatur) und anschließender Zentrifugation bei 4°C für 15 Minuten bei 12.000x g (Eppendorf; Hamburg) in 3 Phasen aufgeteilt.

1. Wässrige Phase: beinhaltet die TotalRNA
2. Weiße Interphase: bestehend aus DNA und kleineren Proteinen
3. Rote organische Phase: insbesondere Proteinen

Durch alleinige Überführung der wässrigen Phase (ca. 350 µL) in ein neues Reaktionsgefäß und Zugabe von 525 µL 100% Ethanol konnte bereits sehr spezifisch RNA isoliert und optimale Bedingungen für alle RNA Moleküle mit einer Länge von maximal 18 Nukleotiden geschaffen werden. Dieses Gemisch aus Ethanol und Nukleotiden wurde in zwei Etappen à 450 µL auf die Silikat-Filtermembran (*RNeasy mini spin column, QIAGEN; Hilden*) pipettiert und bei 10.000facher Erdanziehungskraft zentrifugiert. Durch die Filtermembran wurde die TotalRNA gebunden, während Phenol und Verunreinigungen wie etwa DNA oder kleinere Proteine ausgewaschen wurden. Bei der Hälfte der Proben wurde an diesem Punkt auch ein DNase Verdau auf der Filtermembran durchgeführt. Dazu wurde nach Waschung mit 350 µL RWT-Puffer 10 µL DNase I (3 Kunitz Units/ µL RNase frei-

es Wasser) in 70 μL RDD-Puffer auf die Filtermembranmitte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur erfolgte eine Spülung mit weiteren 350 μL RWT-Puffer bei 12.000 rpm.

In der letzten Phase wurde die hoch aufgereinigte TotalRNA von der Filtermembran in RNase freies Wasser überführt. Dazu wurde zu Beginn die Filtermembran zweimal mit jeweils 500 μL RPE-Puffer gewaschen und bei 12.000 rpm zentrifugiert. Durch die Zugabe des RPE-Puffers wurde die Filtermembran von möglichen Verunreinigungen gereinigt. Die endgültige Isolation der TotalRNA erfolgte durch zweimalige Zugabe von 30 μL RNase freiem H_2O und Zentrifugation für eine Minute bei 12.000 rpm.

3.2.4.3 TotalRNA-Analyse

Mit Hilfe des Spektrophotometer ND-1000 UV/Vis (Firma: NanoDrop; US) konnte die Konzentration an isolierter TotalRNA in ng/mL durch Absorption bei 260 nm (A_{260}) nach jeder RNA-Isolation bestimmt werden. Eine Nullnivellierung (blank) wurde mit 1 μL RNase free Water zu Beginn einer Messung durchgeführt. Die Messung erfolgte stets bei Raumtemperatur. Jede Probe wurde zweimal mit jeweils 1 μL von der gewonnen TotalRNA auf ihre Konzentration bestimmt. Außerdem konnte die Qualität der TotalRNA Isolation an Hand der folgenden Parameter ermittelt werden:

$A_{260} > 0,15$	Angaben, ob signifikante Mengen an RNA vorhanden sind
$A_{260}/A_{280} > 1,9 - 2,1$ (pH = 7,0)	Abschätzung des Reinheitsgrades an RNA Bei einem Absorptionsquotienten zwischen 1,9 und 2,1 bei einem pH von 7,0 kann von einer sauberen RNA (A_{260}) Isolation mit geringgradiger Verunreinigung durch Proteine (A_{280}) ausgegangen werden
A_{260}/A_{230}	Abschätzung des Reinheitsgrades an RNA und des Grades an Verunreinigung durch DNA (A_{230})

Tabelle 16 Parameter zur photospektrometrischen Beurteilung der Reinheit einer miRNA-Isolation; Absorptionsspektren: 230 nm = DNA; 260 nm = RNA; 280 nm = Proteine

3.2.4.4 Herstellung von cDNA

Eine Besonderheit der miRNA Analyse stellt die Tatsache der nur sehr kurzen Nukleotidlängen von 21- 25 nt dar. Im Gegensatz zu mRNA sind miRNAs naturgemäß nicht polyadenyliert. Daher brauchen sie einen initialen Poly(A)-Schwanz, an welchem der Oligonukleotidprimer binden und die reverse Transkription zur DNA einleiten kann. Das Anfügen des Poly(A)-Schwanzes erfolgt über das Enzym Poly(A)-Polymerase. An das so erzeugte Poly(A)-Ende kann nun ein spezieller

Oligonukleotidprimer mit einer universalen Bindungssequenz an seinem 5'-Ende binden und die reife miRNA in cDNA inklusiv Poly(A)-Schwanz umschreiben. Im weiteren Verlauf findet erst die eigentliche Amplifikation statt, da nun die spezifischen Primer an die so entstandene cDNA binden und amplifizieren können (*Abbildung 10*).

Eine weitere Besonderheit stellt die besonders hohe Gefahr des RNA-Abbaus dar. Aus diesem Grund wurden alle Einzelschritte auf Eis vollzogen und die aufgereinigte RNA erst im letzten Schritt zugefügt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, die Bedingungen für jede Probe gleich zu halten, weshalb ein Master Mix angelegt wurde. Auch der Reinigung der Arbeitsflächen und der zu benutzenden Geräte mit dem Enzym DNase free kam eine besondere Bedeutung zu.

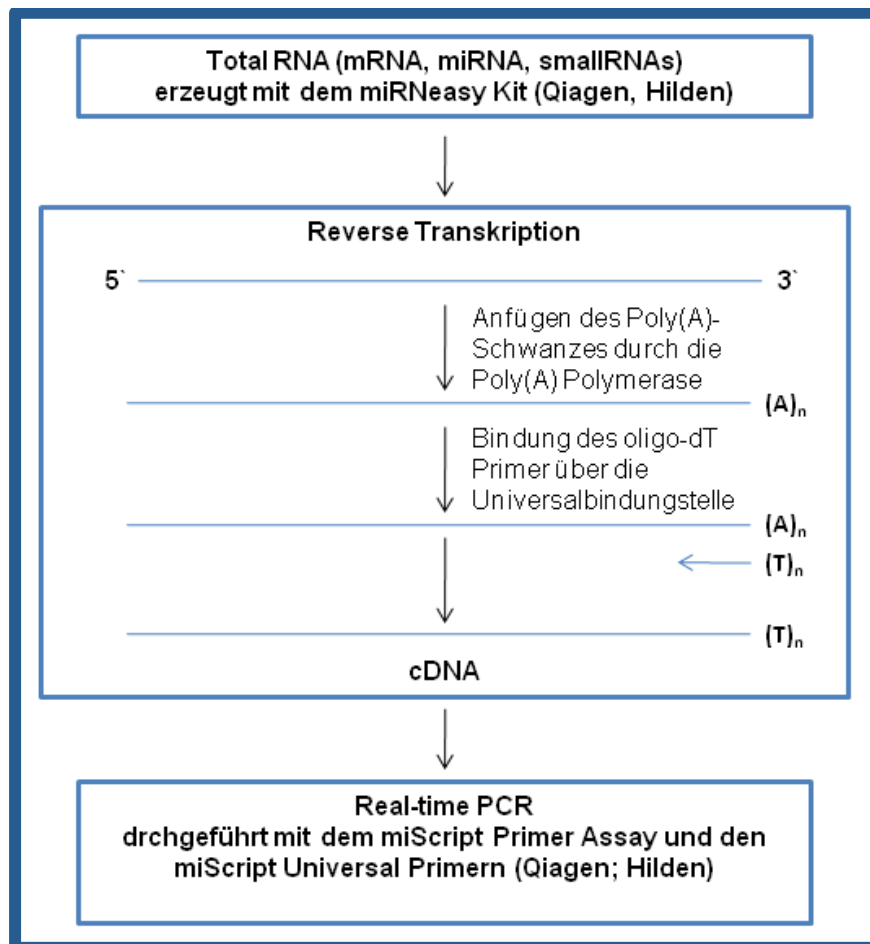


Abbildung 10 Prinzip der miRNA Amplifikation; Angaben gemäß Herstellerangaben, Abbildung modifiziert aus dem miScript System Handbuch der Firma QIAGEN (Hilden)

Die einzelnen Bestandteile der reversen Transkription werden in *Tabelle 17* zusammenfassend dargestellt. Alle Bestandteile stammen dabei aus dem miScript Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen, welches bereits die Enzyme reverse Transkriptase sowie die Poly(A) Polymerase, der Primer in Form eines Oligonukle-

otidprimers mit universaler Bindungsstelle, die Desoxynukleotriphosphate (dNTPs) und Puffer-Substanzen enthält.

Bestandteile	Volumen in μL
miScript RT Buffer, 5x	4
miScript Reverse Transcriptase Mix	1
RNase freies Wasser	variabel
1 μg Template RNA	variabel
Gesamtvolumen	20

Tabelle 17 Zusammensetzung des Reaktionsgemisches zur Durchführung der reversen Transkription

Die *Tabelle 18* zeigt das Protokoll zur Durchführung einer reversen Transkription:

Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Dauer (Minuten)	Vorgang
37	60	Inkubationsphase mit Herstellung der cDNA
95	5	Inaktivierung der miScript Reverse Transcriptase

Tabelle 18 Protokoll zur Herstellung von cDNA

3.2.4.5 Identifikation relevanter miRNAs mit Hilfe eines Array-Systems

Zum Zeitpunkt der Analysen waren bereits über 940 miRNAs (release 15, <http://www.mirbase.org>) im menschlichen Organismus identifiziert worden. Aus diesem Grund wurde das miRNA Array Analyse System der Firma SABiosciences dazu verwendet, mögliche relevante Expressionsunterschiede von 88 unterschiedlichen miRNAs zwischen gesundem und in Folge einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung entzündetem Gewebe zu identifizieren. Dabei wurden drei Gruppen gebildet. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

- Gruppe 1: gesunden Kontrollgruppe
- Gruppe 2: bereits bekannte und histologisch bestätigte Colitis ulcerosa
- Gruppe 3: bereits bekannte und histologisch bestätigter Morbus Crohn

Ausgewählt wurden die Patienten zufällig und alleine durch die sehr hohen Qualitätsanforderungen an die Proben. Alle drei Gruppen mussten jeweils drei strenge, vom Hersteller aufgeführte, Qualitätskriterien erfüllen, um mögliche Ergebnisverfälschungen durch Verunreinigungen bei der TotalRNA-Isolation zu minimieren. Diese setzten sich zusammen aus:

$A_{260}/A_{230} > 1.7$	Ausschluss von DNA-Verunreinigungen
$A_{260}/A_{280} > 2.0$	Ausschluss von Protein-Verunreinigungen
Konzentration von $A_{260} > 10 \mu\text{g/mL}$	Sicherstellung ausreichender RNA-Menge

Tabelle 19 Qualitätsgütekriterien des RT² miRNA PCR Array System MAH-001A

Analysiert wurden dabei ausschließlich Dickdarmbiopsien, um auf diese Weise die Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen zu gewährleisten. Auf Grund dieser sehr strengen Gütekriterien wurde eine Auswertung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten festgesetzt. Das Ziel des ersten Analysezeitpunktes (zwei Proben pro Gruppe) beinhaltete die Schaffung eines Überblickes über das Bewertungssystem des Herstellers, dem Ausschluss von Fehlern des Analyseverfahrens und der Überprüfung der Effizienz des Systems. Im Rahmen des zweiten Analysezeitpunktes sollten bei voller Ausnutzung des Systems (drei Proben pro Gruppe) die Ergebnisse der ersten Analyse überprüft und bestätigt werden. Die Patientendaten aus der ersten Analyse wurden dabei erneut berücksichtigt.

Die Auswertung erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers über einen Upload der gewonnenen Messwerte auf eine Internetplattform der Firma SABiosciences (<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>, zuletzt am 05.11.2009). Die Auswertung durch den Hersteller erfolgte dabei unter Einbeziehung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Die p-Werte wurden dabei an Hand eines nicht näher spezifizierten Tests vom Programm ausgegeben. Auf eine Korrektur für multiples Testen wurde dabei nicht hingewiesen.

3.2.4.6 Durchführung von Echtzeit-PCR-Analysen

Bei der Echtzeit-PCR (engl. real-time PCR) wird die Produktakkumulation in Echtzeit verfolgt, um auf diese Weise die exponentielle Phase einer Reaktion verfolgen zu können und in der Folge für eine Quantifizierung der Templatmenge zu nutzen. Dabei erfolgt die Messung der Produktzunahme durch die Verwendung von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit von der Produktmenge generiert wird und proportional abhängig von der Menge des amplifizierten Produktes ist.

Für die Durchführung einer Echtzeit-PCR gibt es unterschiedliche Protokolle. In der vorliegenden Arbeit wurde ein SYBR Green basierendes Protokoll verwendet. SYBR Green stellt dabei einen Fluoreszenzfarbstoff dar, der an doppelsträngige DNA binden kann. Durch die Zugabe von SYBR Green zu einem PCR Ansatz bewirkt man somit, dass dieser Farbstoff in jeder Annealing- bzw. Extensions-Phase der ablaufenden PCR-Reaktion an die entstehenden doppelsträngigen DNA Produkte bindet und ein Fluoreszenzsignal aussendet, welches proportional zur entstandenen Menge an Amplifikationsprodukten ist und vom Laserlicht (Wellenlänge: 490 nm) gestützten Detektionssystem der Echtzeit-PCR Maschine erfasst werden kann. In der anschließenden Denaturierungsphase der PCR-Reaktion

werden die Doppelstränge wieder in Einzelstränge getrennt, was eine Ablösung des SYBR Green zur Folge hat. Durch die Aufzeichnung der emittierten Fluoreszenzsignale während des gesamten Laufs durch das Echtzeit-PCR Gerät erhält man ein quantitatives Maß für die Menge des im Reaktionsansatz enthaltenen Produktes in Abhängigkeit von der durchlaufenen Zykluszahl. Die Spezifität der Ergebnisse wird bei der SYBR Green Technik alleine durch die verwendeten Oligonukleotid-Primer garantiert, deren Sequenz hoch spezifisch auf das zu analysierende Zielgen ausgerichtet ist.

Bei der Verwendung des SYBR Green basierten Verfahrens wurden im Echtzeit-PCR Ansatz die in der *Tabelle 20* dargestellten Komponenten zu einem Gesamtvolumen von 30 µL zusammengefügt und auf eine 96-well PCR-Platte pipettiert:

Komponenten	Volumen in µL
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	15
10x miScript Universal Primer	3
10x miScript Primer Assay	3
RNAse freies Wasser	7,7
Template cDNA	1
Fluoreszein (bei BioRad iCycler notwendig)	0,3
Gesamtvolumen	30 µL

Tabelle 20 Komponenten zur Durchführung einer Echtzeit-PCR

Der 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix enthielt neben der Taq-DNA-Polymerase die dNTPs und einen für die Durchführung der Echtzeit-PCR optimierten Puffer unter anderem mit 2,5 mM MgCl₂.

Alle Ansätze wurden als Doppelwerte auf eine 96-well Echtzeit-PCR Platte pipettiert und anschließend mit dem iCycler der Firma BioRad gemessen. Bei der verwendeten Taq-DNA-Polymerase handelte es sich um eine sogenannte Hot-Start-Polymerase, welche durch eine 15 minütige Inkubation bei 95°C in der Aktivierungsphase aktiviert wurde. Das angewendete Laborprotokoll zur Durchführung der Echtzeit-PCR ist aus der Tabelle 21 ersichtlich:

Phase	Temperatur (°C)	Dauer	Wiederholung
Aktivierungsphase	95	15 min	einmalig
Denaturierungsphase	94	15 s	
Anbindungsphase	55	30 s	40 Zyklen
Verlängerungsphase	70	30 s	

Tabelle 21 Protokoll zur Durchführung einer Echtzeit-PCR

3.2.4.7 Methoden zur Quantifizierung und Effizienzbestimmung

Heute wird nicht mehr primär in DNA Produktmengen/ -konzentrationen gerechnet, weshalb nun zur Quantifizierung der Startmenge sogenannte Ct (Cycle Threshold; Synonym: CP, Crossing Point) Werte herangezogen werden. Diese Werte entsprechen der Anzahl an Zyklen, welche nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Somit befindet sich am Crossing Point in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Geht man beispielsweise von einer 100% Effizienz der PCR aus, bedeutet dieses, dass sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal verdoppelt. Ist der Crossing Point Wert beispielsweise in Probe A um eine Einheit geringer als in Probe B, so hat sich in Probe A die doppelte Menge an cDNA zu Beginn befunden als in Probe B.

Der direkte Vergleich von Proben an Hand ihrer Crossing Point Werte ist jedoch nicht zulässig, da auf diese Weise die Varianz der Expressionsergebnisse auf Grund von Gewebe- und Matrixeffekten, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen, unterschiedlichen Ausgangsmengen an cDNA als auch Fehlern während der Echtzeit-PCR innerhalb einer Probe nicht berücksichtigt werden würde.

Zur Bestimmung der Genexpressionslevel wurden daher zwei unterschiedliche Strategien entwickelt:

- Die **absolute Quantifizierung** mittels Kalibrierkurve basierend auf einer Verdünnungsreihe von Echtzeit-PCR Produkten.
- Sowie die **relative Quantifizierung**, welche die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ bezieht (Vorgang wird auch Normalisierung genannt).

In dieser Arbeit wurde die Strategie der relativen Quantifizierung verwendet, wobei als „Housekeeping Gen“ für die Analyse der Genexpression von miRNAs das Gen RNU-6b empfohlen wird und zur Anwendung kam.

Die Vorteile in diesem Vorgehen liegen in einer Reduktion der Varianz der Expressionsergebnisse, da sowohl das Zielgen wie auch das Housekeeping Gen gleichermaßen betroffen sind. Jedoch bedarf es zur Normalisierung der Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio). Dazu wurde in der vorliegenden Arbeit die $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode verwendet.

In dieser Methode wird in einem ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert.

Der Ct-Wert ergab sich dabei aus dem Mittelwert von zwei getrennt voneinander durchlaufenen Echtzeit-PCR Analysen.

$$(1) \Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Referenzgen})$$

Nach dieser Normierung wurde vom ΔCt -Wert der experimentell untersuchten Probe (Patientenprobe mit Gewebe bei Morbus Crohn oder bei Colitis ulcerosa) der ΔCt -Wert der Kontrollgruppe abgezogen, um auf diese Weise eine Kalibrierung durchzuführen. Dabei wurde erneut aus den ΔCt -Werten der Kontrollgruppe der Mittelwert organabhängig gebildet (Kolon vs terminales Ileum).

$$(2) \Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{CED}) - \Delta Ct (\text{Kontrollgruppe})$$

Auf diese Weise ergibt sich das „delta-delta Ct“ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Erkrankung (Morbus Crohn / Colitis Ulcerosa) und der Kontrolle ergibt sich in Form einer Ratio aus folgender arithmetischer Formel, welche zum Referenzgen normalisiert und auf eine Standardprobe bezogen wurde:

$$(3) \text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die so berechneten Werte wurden anschließend in das Statistikprogramm SPSS (Version 12.) übernommen und über statistische Tests miteinander verglichen.

3.2.5 Analyse von Datenbankinhalten über miRNAs

Diese Arbeit setzte sich zum einen mit der Fragestellung nach Unterschieden im Expressionsverhalten von miRNAs im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung auseinander. Ein anderes Ziel stellte die Untersuchung der von diesen miRNAs regulierten Proteine dar. Auf diese Weise sollten theoretische Aussagen über die Bedeutung, die Lokalisation innerhalb der Zelle bzw. des Organismus, die Funktion und den Pathway dieser regulierten Proteine gewonnen werden. Das Ergebnis dieser ausgiebigen Datenbankanalysen zielte auf der Schaffung einer Grundlage für gezielte, funktionelle Untersuchungen zu den miRNAs als auch zu den Pathogenesemechanismen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ab.

Datenbank	Funktion
miRBase des Sanger Instituts (V13)	miRNA -> Proteine
GOID (GeneOntologyID)	Proteine -> Gene Ontology ID
GOA (GenOntology)	GeneOntologyID -> Funktion, Ort, Pathway

Tabelle 22 Verwendete Datenbanken zur Untersuchung der Funktion, der Lokalisation und des Pathways der von den miRNAs regulierten Proteine

In der miRBase Datenbank, geführt durch das Sanger Institut, wird zu jeder miRNA die von ihr regulierten Proteine aufgelistet. Dabei beziehen sich die Daten

jedoch nicht ausschließlich auf bereits experimentell bestätigte Angaben, sondern auch auf computerbasierten DNA-Analysen, aus welchen eine Wahrscheinlichkeit für eine Beteiligung einer entsprechenden miRNA in die Regulation von Proteinen wiedergespiegelt wird.

Im nächsten Schritt wurde zu jedem der genannten Proteine die entsprechende Gene Ontology Identifikationsnummer (ID) über die GOID Datenbank zugeordnet. Die GeneOntology-Datenbank ist das Ergebnis einer internationalen Bioinformatikinitiative, welche als Zielsetzung die Vereinheitlichung des biowissenschaftlichen Vokabulars hat. Jeder Terminus setzt sich aus dem Namen, einer Nummer und den jeweiligen assoziierten Daten zusammen. Durch die Datenbank werden die Bereiche „zelluläre Komponente“, „biologischer Prozess“ und molekulare Funktion“ abgedeckt.

An Hand dieser IDs konnten somit nun ebenfalls aus Computeranalysen gewonnene und durch Experimente auch teilweise belegte Daten über die Funktion, die Lokalisation und die Pathways dieser Proteine erzielt werden.

Da eine miRNA für gewöhnlich auf unterschiedliche Art und Weise mehrfach mit einem regulierten Protein in Verbindung gebracht werden kann, wurde die Anzahl dieser Nennungen gezählt. Auf diese Weise ergab sich zusätzlich eine hierarchische Struktur, welche bestimmte Proteine besonders hervorhebt. Die zehn am meisten regulierten Proteine pro deutlich veränderter miRNA wurden am Ende auf genauere Informationen bezüglich bereits durchgeführter Veröffentlichungen über die wissenschaftliche Veröffentlichungsdatenbank PubMed untersucht.

In der *Abbildung 11* wird dieser Vorgang anschaulich dargestellt:

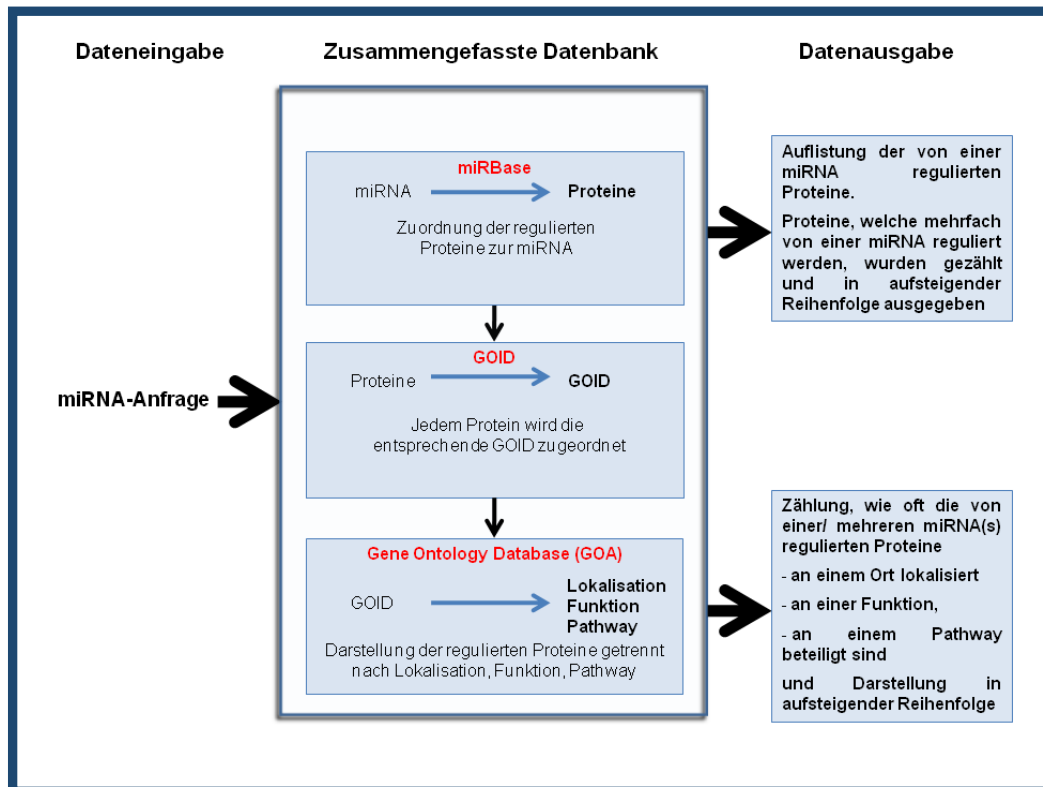


Abbildung 11 Ablaufschema der datenbankgestützten Untersuchung

3.2.5.1 Quellcodes zur datenbankgestützten Untersuchung der von den miRNAs regulierten Proteine

Zur Durchführung der Datenbankanalysen wurde nach folgenden Eingabebefehlen differenziert:

A) Untersuchung von einer miRNA

A1) Ausgabe, welche Proteine von dieser einen miRNA reguliert werden und Sortierung nach aufsteigender Reihenfolge:

```
SELECT name, COUNT(*) FROM mirna WHERE seq='hsa-miR-XX'
GROUP BY name ORDER BY COUNT(*);
```

A2) Ausgabe zu Angaben über Lokalisation, Funktion und Pathway der von einer miRNA regulierten Proteine und Zählung dieser in aufsteigender Reihenfolge:

```
SELECT goa.value5, goid.name, goid.category, proteins.seq,
COUNT(*) FROM goa, (SELECT * FROM mirna WHERE seq='hsa-miR-
XX' LIMIT 900000) proteins, goid WHERE goa.value3=proteins.name
AND goa.value5=goid.goid GROUP BY goa.value5 ORDER BY
COUNT(*);
```

B) Untersuchung von mehreren miRNAs auf Gemeinsamkeiten:

B1) Ausgabe, welche Proteine von diesen mehreren miRNAs gleichzeitig reguliert werden und Sortierung nach aufsteigender Reihenfolge:

```
SELECT name, COUNT(*) FROM mirna WHERE seq='hsa-miR-XX' OR  
seq='hsa-miR-XY' OR seq='hsa-miR-XZ' GROUP BY name ORDER BY  
COUNT(*);
```

B2) Ausgabe zu Angaben über Lokalisation, Funktion und Pathway der von mehreren miRNAs gleichzeitig regulierten Proteine und Zählung dieser in aufsteigender Reihenfolge:

```
SELECT goa.value5, goid.name, goid.category, proteins.seq,  
COUNT(*) FROM goa, (SELECT * FROM mirna WHERE seq='hsa-miR-  
XX' OR seq='hsa-miR-XY' OR seq='hsa-miR-XZ' LIMIT 900000) pro-  
teins, goid WHERE goa.value3=proteins.name AND  
goa.value5=goid.goid GROUP BY goa.value5 ORDER BY COUNT(*);
```

Die grauen Flächen stellen dabei individuell ersetzbare Felder dar. Möchte man etwa die im Menschen vorkommende miRNA-18a untersuchen, wählt man den Begriff **'hsa-miR-18a'**. Dabei steht die Abkürzung „hsa“ vor der miRNA für Homo sapiens und schränkt somit die Untersuchung auf menschliche miRNA ein (Ausnahme auf Grund der Benennung: let-7d = **'hsa-let-7d'**)

Bei der Fragestellung, welche Proteine gemeinsam von mehreren miRNAs reguliert werden, hat sich das Einfügen eines LIMITs als effektiv gezeigt, um auf diese Weise die Rechenzeit von einem Tag auf 3 Stunden zu reduzieren. Das LIMIT wurde dabei mit einer Dimension von 900.000 so hoch gewählt, dass es zu keinen Verschiebungen in der hierarchischen Auflistung der Ergebnisse kam, sondern lediglich die Summe an gemeinsamen Treffern etwas niedriger ausfiel.

3.2.5.2 Cytoscape mit Plugin ClueGO

Die frei zugängliche Software Cytoscape entstand aus einem Kooperationsprojekt von drei amerikanischen Instituten. Das Ziel war die Schaffung einer Softwareplattform, mit welcher biomolekulare Interaktionsnetzwerke veranschaulicht werden können. Somit ist es besonders für die Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, Protein-DNA-Interaktionen und Geninteraktionen ausgelegt, wobei der Schwerpunkt durch die Plug-In-Architektur individuell bestimmt werden kann (251). Mit Hilfe des Plug-In ClueGO können Inhalte aus den Bioinformatik-

Datenbanken GeneOntology (GO), der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) sowie der BioCarta ausgewählt werden. Die so gewählten Daten können miteinander in Bezug gesetzt, in Funktionsgruppen geordnet und als ein funktionelles Netzwerk in veranschaulichender Darstellung ausgegeben werden. Zusätzlich ist es möglich Genlisten zu analysieren oder miteinander zu vergleichen. Da in dieser Arbeit mit der Ontologie der GeneOntology Datenbank gearbeitet wurde, wurde zur Analyse auch diese verwendet. Als biologische „Bedingung“ wurde die durch die miRNAs gemeinsam regulierten Proteine (vgl. 3.2.5.1. mit dem Quellcode B1 ermittelt) gewählt, welche anschließend durch ClueGO in einem funktionell gruppierten Netzwerk analysiert und ausgegeben wurde.

In der *Abbildung 12* wird die Eingabemaske als Screenshot mit den verwendeten Einstellungen gezeigt:

Die Einstellungen wurden dabei, wie dargestellt, gesetzt:

Als **Analysetyp** für das zu untersuchende Gencluster besteht die Wahl zwischen einer Einzel- oder einer Vergleichsanalyse, wobei in dieser Arbeit die Einzelanalyse zum Einsatz kam.

Da ein **Gencluster** bestehend aus menschlichen Genen analysiert wurde, wurde „Homo Sapiens“ als Ursprungsort mit der „SymbolID“-Betitelung gewählt. In das „Text Field“ erfolgte die Kopie der unter 3.2.5.2. mit dem Quellcode B1 ermittelten, gemeinsam regulierten Proteine.

Unter dem Oberpunkt „**ClueGO Settings**“ wurde die Ontologie „GO_ImmuneSystemProcess_22.06.2012“ mit der Evidence „All“ ausgewählt. Es erfolgte vor der Analyse ein Update der Datenbank über die implementierte Updatefunktion, wobei der 22.06.2012 die aktuellste Version der Datenbank zum Analysezeitpunkt darstellte.

Die **statistische Auswertung** erfolgte über einen zweiseitigen hypergeometrischen Test, also der Auskunft über die Wahrscheinlichkeit, wie oft ein gewünschtes Element in einer Stichprobe vorkommt. Zur Reduktion falsch positiver Aussagen bei multipler Testung erfolgte eine Korrektur nach Bonferroni. Zusätzlich wurde eine Glättung der diskreten hypergeometrischen Verteilungskurve über die Bestimmung des „mid-p-values“ vorgenommen, wodurch die Ergebnisse präzisiert werden konnten.

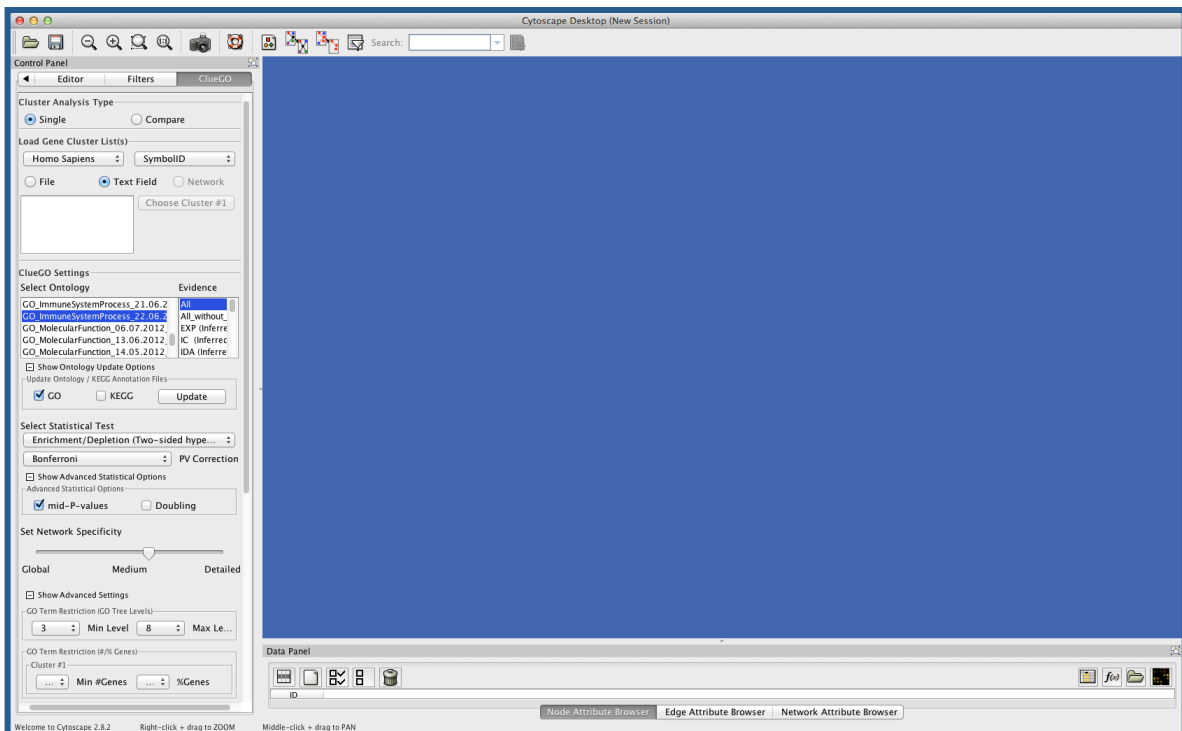


Abbildung 12 Screenshot von Juni 2012 der Eingabemaske von Cytoscape mit geladenem Plugin ClueGO

Einstellungen zur **Netzwerkspezifität** konnten entweder global oder in einem fortgeschrittenen Modus getroffen werden. In dieser Arbeit wurde die fortgeschrittene Einstellungsform ausgesucht. Die Filterkriterien dieser Form waren zum einen die GO Levels, die Anzahl der zu berücksichtigenden Gene, sowie der Prozentsatz der gemappten Gene. Zur Erlangung eines Überblickes wurde somit ein niedriges GO Level (zum Beispiel 0-5), eine hohe Anzahl an assoziierten Genen sowie ein niedriger prozentualer Anteil an gemappten Genen gewählt. Spezifische Terme ließen sich über ein hohes GO Level (zum Beispiel 8-14) mit wenig assoziierten Genen (zum Beispiel 1) und einem hohen prozentualen Mapping-Anteil von 50% und mehr finden. Auch die Wahrscheinlichkeit für signifikante Ergebnisse stieg mit einer detaillierteren Auswahl. Die in dieser Arbeit getroffenen Einstellungen lauteten:

Einstellungskriterium	Gewählte Einstellung
GO Level Minimum	8
GO Level Maximum	15
Berücksichtigte Gene	ALL
%-Satz gemappter Gene	50%

Tabelle 23 Darstellung der unter ClueGO ausgewählten Parameter zur Definition der Ausgabe der Netzwerkspezifität

Im Rahmen der **Visualisierung** konnte die Netzwerkgestaltung über die Verwendung eines KappaScores beeinflusst werden. Durch die Bestimmung der In-

terater-Reliabilität, also das Ausmaß der Übereinstimmung (Konkordanz) der Einschätzungsergebnisse bei unterschiedlichen Beobachtern, können die Terme in sinnvolle funktionelle Einheiten gruppiert werden. KappaScore Werte von 1 sprechen für eine hohe Konkordanz und somit große Objektivität. Somit bleiben unter dieser Einstellung auch nur noch Terme miteinander verlinkt, welche beinahe alle Gene miteinander teilen. In dieser Arbeit wurde ein Kappa-Score von 0,95 gewählt.

Die durch diese Einstellungen definierte **Netzwerkausgabe** zeigt die miteinander in Beziehung stehenden Knoten. Einheitlich farbig hervorgehoben werden dabei die Knoten, welche zu einer Gruppe gehören. Der „Leader“ der Gruppe wird dabei mit einem entsprechenden farbigen Schriftzug hervorgehoben. Die Signifikanz eines Knotens wird durch seinen Durchmesser zum Ausdruck gebracht, wobei dieser wiederum durch die nach Bonferroni korrigierten p-Werte definiert wird. Die Verlinkung der einzelnen Knotenpunkte untereinander erfolgt gemäß dem ausgewählten KappaScore.

3.2.6 Statistik

3.2.6.1 Einschlusskriterien

Das Patientenkollektiv ergibt sich aus den Patienten der endoskopischen Abteilung der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz. Eingeschlossen wurden alle Patienten zwischen 18 und 100 Jahren, welche entweder zum Zeitpunkt der Untersuchung gesund waren oder an einer endoskopisch sowie histologisch bestätigten chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) litten. Patienten, bei denen im Nachhinein eine infektiöse Kolitis diagnostiziert wird, wurden als infektiöse Patientengruppe erfasst.

3.2.6.2 Ausschlusskriterien

Ergebnisse von Patienten, welche im Rahmen der Echtzeit-PCR Analyse vom Gesamtbild deutlich abweichende relative Expressionsverhältnisse aufwiesen, wurden einer erneuten genaueren Betrachtung unterzogen. Wiesen die Ergebnisse bei mehr als einem Drittel der zwölf analysierten miRNAs deutlich abweichende Werte auf, mussten die Proben als generell verunreinigt gewertet und somit ausgeschlossen werden. Erwies sich im Vergleich zum Gruppenkollektiv ein einzelner Wert als überdurchschnittliche erhöht (Wert >30), konnte ausschließlich der einzelne Wert als verunreinigt gewertet und somit ausgeschlossen werden.

3.2.6.3 Studiendesign

Diese explorative, experimentelle Studie wurde monozentrisch an der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die erfassten Patienten wurden in vier Subgruppen aufgeteilt, welche sich aus einer gesunden Kontrollgruppe, einer infektiösen und den zwei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungsgruppen in Form von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammensetzten. Die Gruppe der Morbus Crohn Patienten musste auf Grund des unterschiedlichen Befalls von Dickdarm und Dünndarm in Form des terminalen Ileums getrennt betrachtet werden. Das Kolon wird dabei als Einheit bestehend aus Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Sigmoidum und Rektum definiert. Hintergrund für diese getrennte Betrachtungsweise ist die unterschiedliche Immunsituation in den Darmabschnitten des Dickdarms im Vergleich zum Dünndarm. Untersucht wurde in allen Gruppen der relative Gehalt an miRNA für die miRNAs let7d, 15a, 19a, 19b, 22, 30e, 101, 141, 185, 374b, 424. Als Referenzgen diente die RNU6b. Der Vergleich auf Unterschiede in den Gruppen erfolgte zum einen untereinander, zum anderen wurden aus demselben Patienten stammende entzündete und gesunde Gewebsabschnitte untersucht. Außerdem wurde untersucht, ob noch weitere Parameter wie Alter, Geschlecht, Therapie und die Erkrankungsdauer einen Einfluss auf die miRNA Expression aufwiesen.

3.2.6.4 Fallzahl

Es handelt sich bei der Untersuchung um eine explorative Studie, welche das Ziel hatte, mögliche Wege zur Erforschung und Entwicklung von neuen Behandlungsstrategien aufzuzeigen. Aus diesem Grund wurden Gruppengrößen von bis zu 20 Personen pro Gruppe angestrebt. Auf Grund der getrennten Beurteilung von Dünn- und Dickdarm in der Morbus Crohn Gruppe fielen in dieser die Einzelgruppen kleiner aus.

3.2.6.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgt unter zur Hilfenahme des Statistikprogrammes SPSS 12.0. Es wird mit einer Korrelationsanalyse zum Ausschluss von Konfoundern begonnen. Die untersuchten Variablen setzen sich aus dem Geschlecht, Alter, der Erkrankungsaktivität und -dauer, der Stelle der Biopsieentnahme, der Anzahl der Erkrankungsjahre, der einzelnen miRNAs sowie der Therapie zusammen. Es folgt die Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson sowie die graphische Darstellung aller Korrelationen $>0,9$ mit hoher Signifikanz. Im Anschluss

werden die Ergebnisse beginnend mit ihrer Epidemiologie beschrieben. Fortführend findet eine deskriptive Beschreibung mit Angaben zum Mittelwert, dem Maximum, dem Minimum sowie der Verteilung statt. Außerdem erfolgt jeweils eine graphische Darstellung via Boxplots mit Angaben der 1., 2. und dritten Quartile, sowie Ausreißern zu den jeweiligen miRNAs. Basierend auf den deskriptiven Daten erfolgt die Testentscheidung. Dabei kann in dieser Arbeit - bedingt durch die kleinen Gruppengrößen - keine Aussage zu absoluten Signifikanzen gemacht werden, sondern es werden nur Tendenzen auf Signifikanz dargelegt. Als Tests kommen im Rahmen der verbundenen Gruppenanalysen unter Annahme der Normalverteilung der verbundene t-Test, bei fehlender Normalverteilung der Wilcoxon-Test zum Einsatz.

Bei dem unverbundenen Gruppenvergleich wird erneut der Test abhängig von der Normalverteilung gewählt. Handelte es sich um eine normalverteilte Größe, fällt die Entscheidung auf den unabhängigen t-Test für mehrere Größen. Bei nicht bestehender Normalverteilung wird zuerst der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Erzielt der Vortest einen p-Wert $<0,5$, erfolgt anschließend ein post-hoc-Test in Form des Mann-Whitney-Testes.

4 Ergebnisse

4.1 Epidemiologische Darstellung des erfassten Kollektivs

In der Studie wurden insgesamt 163 Proben von 131 Patienten an der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz innerhalb des Zeitraumes von November 2008 bis Juli 2009 erfasst. Eine epidemiologische Zusammenfassung repräsentiert die *Tabelle 24*:

	Kontrollen	CU_g	CU_entz	MC_g	MC_entz	IC_g	IC_entz
Anzahl an Proben	38	18	29	28	32	5	13
Geschlecht							
Weiblich	19 (50%)	5 (27,8%)	8 (27,6%)	12 (42,9%)	16 (50,0%)	1 (20%)	6 (42,6%)
Männlich	19 (50%)	13 (72,7%)	21 (72,4%)	16 (57,1%)	16 (50,0%)	4 (80%)	7 (53,8%)
Alter							
Median (Jahren)	61	51,5	50	45	43,5	54	44,5
Altersspanne	18 - 82	20 - 68	20 - 82	20 - 65	17 - 65	35 - 70	27 - 63
Ort der Biopsie							
Rectum	5 (13,2%)	4 (22,2%)	21 (72,4%)	4 (14,3%)	1 (3,1%)	1 (20%)	4 (30,8%)
Sigmoideum	3 (7,9%)	2 (11,1%)	4 (13,8%)	2 (7,1%)	6 (18,8%)	0	5 (38,5%)
Descendens	2 (5,3%)	2 (11,1%)	1 (3,4%)	5 (17,9%)	1 (3,1%)	0	0
Transversum	20 (52,6%)	6 (33,3%)	3 (10,3%)	13 (46,4%)	6 (18,8%)	3 (60%)	2 (15,4%)
Ascendens	2 (5,3%)	2 (11,1%)	0	0	2 (6,3%)	0	0
Coecum	1 (2,6%)	0	0	0	1 (3,1%)	1 (20%)	0
Term. Ileum	5 (13,2%)	2 (11,1%)	0	4 (14,3%)	15 (46,9%)	0	2 (15,4%)
Erkrankungsjahre							
Median (Jahren)		20	13,5	10	13		
Spanne		0 - 44	0 - 29	0 - 30	0 - 33		
Fehlende Angaben		9	17	11	13		
Therapie							
Mesalamine	0	2 (11,1%)	1 (3,4%)	3 (10,7%)	5 (15,6%)	0	0
Antibiotika	0	1 (5,6%)	1 (3,4%)	0	0	2 (40%)	5 (38,5%)
Steroide	0	1 (5,6%)	3 (10,3%)	1 (3,6%)	2 (6,3%)	0	0
Immunmodulatoren	0	7 (38,9%)	12 (41,4%)	14 (50%)	14 (43,8%)	1 (20%)	0
Biologics	0	1 (5,6%)	2 (6,9%)	6 (21,4%)	6 (18,8%)	0	0
ohne Therapie	36 (94,7%)	2 (11,1%)	2 (6,9%)	3 (10,7%)	2 (6,3%)	2 (40%)	8 (61,5%)
Therpieresistenz	0	1 (5,6%)	2 (6,9%)	0	0	0	0
post OP	1 (2,6%)	0	0	0	1 (3,1%)	0	0
Keine Angaben	1 (2,6%)	3 (16,7%)	6 (20,7%)	1 (3,6%)	2 (6,3%)	0	0

Tabelle 24 Epidemiologische Daten zum erfassten Probenkollektiv; Patientendaten wurden in Gruppen definiert nach Art und nach Aktivität der Erkrankung geordnet. Pro Gruppe Darstellung der Daten nach Anzahl an erfassten Patienten, dem Geschlecht, dem Alter, der Lokalisation der Biopsieentnahme, den Erkrankungsjahren sowie der Therapie zum Zeitpunkt der Biopsieentnahme. Prozentangaben wurden gerundet und beziehen sich dabei auf die Gesamtzahl an Patienten pro Gruppe. Definition der Gruppentitel: Kontrolle = Kontrollgruppe bestehend aus Vorsorgepatienten (n = 37) und einem Patienten zur Kontrolle nach einer Divertikulitis-OP; gesund (g_) = nicht entzündetes Gewebe, aktiv (entz_) = entzündetes Gewebe; CU = gesicherte Diagnose einer Colitis ulcerosa (n = 35 Patienten); MC = gesicherte Diagnose eines Morbus Crohn (n = 44 Patienten); IC = gesicherte Diagnose einer infektiösen Kolitis (bakteriell / virologisch) (n = 13 Patienten)

4.1.1 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe setzt sich aus 38 Patienten zusammen, von denen die Hälfte der Patienten (n = 19) weiblichen, die andere Hälfte (n = 19) männlichen Ge-

schlechtes waren. Das Alter lag im Median bei 61 Jahren. Die Biopsien erfolgten aus dem Rektum (5 Biopsien), dem Dickdarm (28 Biopsien) sowie dem Terminalen Ileum (5 Biopsien). 36 Patienten (95%) hatten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Therapie erhalten, ein Patient (3%) kam im Rahmen einer regulären postoperativen Nachkontrolle bei Zustand nach rezidivierender Divertikulitis. Von einem weiteren Patienten lagen zum Untersuchungszeitpunkt keine weiteren Daten vor (3%).

4.1.2 Morbus Crohn

Das Kollektiv der unter Morbus Crohn Erkrankten setzte sich insgesamt aus 44 Patienten zusammen. Wie bereits dargestellt wurde zwischen der Gruppe mit entzündetem und der Gruppe mit gesundem Gewebe unterschieden.

4.1.2.1 Nicht-entzündliche Biopsien bei Morbus Crohn

Nicht-entzündliches Gewebe konnte bei 28 Patienten entnommen werden, wobei bei 16 der 28 Patienten zwei Proben (eine nicht-entzündete und eine entzündete Biopsie) gewonnen wurden. Bei weiteren 12 Patienten befand sich die Erkrankung zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Remission. Die Patienten waren zwischen 20 und 65 Jahren alt und hatten ein medianes Alter von 45 Jahren. Zwölf Patienten (43%) waren weiblichen, 16 Patienten (57%) männlichen Geschlechts. Die Biopsien wurden bevorzugt aus dem Colon transversum (n = 13; 46%) sowie dem terminalen Ileum (n = 4; 14%) gewonnen. Die Erkrankungsdauer lag im Median bei 10 Jahren (Spannbreite von 0 – 30 Jahre) seit Erstdiagnose. Jedoch lagen von 11 Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Angaben vor. 24 Patienten standen zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Therapie, welche bei einem Großteil der Patienten aus Immunmodulatoren (n = 14; 50%) bestand. Zu einem Patienten (4%) gab es keine Angaben, da die Erkrankung neu diagnostiziert wurde.

4.1.2.2 Entzündliche Biopsien bei Morbus Crohn

In der Gruppe mit aktivem Morbus Crohn fanden sich insgesamt 32 Patienten mit einer floriden Entzündung. Die Hälfte der Patienten war weiblich, die andere Hälfte männlich. Das Alter lag im Median bei 43,5 Jahren mit einer Spannbreite von 17 bis 65 Jahren. Die Biopsien wurden gemäß der typischen Ausprägung eines Morbus Crohn bevorzugt dem terminalen Ileum (n = 15; 47%) entnommen. 16 Biopsien (50%) kamen aus dem Dickdarm, eine Probe (3%) aus dem Rektum. Die Therapie basierte primär auf der Gabe von Immunmodulatoren (n = 14; 44%). Biologics erhielten sechs Patienten (19%), Mesalamine fünf Patienten (16%). Außer-

dem wurden zwei Patienten (6%) mit Steroiden behandelt. Ein Patient hatte wegen Fisteln eine OP erhalten und wies noch entzündete Areale auf (3%). Im Median litten die Menschen bereits seit 13 Jahren (Spannbreite von 0 – 33 Jahren) unter der Erkrankung. Auch hier fehlten jedoch von 13 Patienten Angaben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose.

4.1.3 Colitis ulcerosa

Die Gruppe der Colitis ulcerosa Patienten umfasst insgesamt 35 Personen. Von diesen 35 Patienten konnten bei 12 Patienten zwei Proben gewonnen werden – nämlich aus entzündetem wie auch aus gesundem Gewebe. Von sechs Patienten wurden ausschließlich entzündungsfreie Biopsien entnommen, da diese zum Zeitpunkt der Untersuchung einen entzündungsfreien Darm aufwiesen. Von weiteren 17 Patienten stammten ausschließlich entzündete Gewebeproben.

4.1.3.1 Nicht-entzündliche Biopsien bei Colitis ulcerosa

Die 18 nicht-entzündlichen Biopsien kamen von Patienten, welche zwischen 20 und 68 Jahre alt (medianes Alter: 51,5 Jahren) waren. Fünf Patienten waren weiblichen, 13 Patienten männlichen Geschlechts. Die Biopsien wurden gemäß dem Krankheitsmuster und der besseren Vergleichbarkeit bevorzugt aus dem Rektum (n = 4; 22%) und dem Kolon (n = 12; 66,6%) gewonnen. Die Erkrankungsdauer lag mit einem Median bei 20 Jahren (Spannbreite von 0 – 44 Jahre) seit Erstdiagnose. Von 9 Patienten lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Angaben vor. 12 Patienten standen zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Therapie, wobei die meisten von diesen Immunmodulatoren (n = 7; 39%) erhielten. Ein Patient sprach bereits auf keine der Standardtherapien mehr an, befand sich aber dennoch in Remission. Zwei der Patienten (11%) wiesen keine Therapie auf. Zu drei Patienten (17%) gab es keine Angaben, da es sich um Erstdiagnosen handelte.

4.1.3.2 Entzündliche Biopsien bei Colitis ulcerosa

Neben den 12 Patienten mit Doppelproben gab es 17 weitere Patienten mit einer aktiven Colitis ulcerosa. Die meisten der untersuchten Patienten waren männlich (n = 21, 72%) mit einem medianen Alter von 50 Jahren (Spannweitenbreite: 20 - 82 Jahre). Bevorzugter Entnahmeort für die Biopsien war gemäß der typischen Ausprägung einer Colitis ulcerosa das Rektum (n = 21; 72%). Bei acht Patienten bestand bereits eine Pankolitis. Biopsien wurden deshalb vier mal aus dem Bereich des Sigmoideum, einmal aus dem Colon descendens (3%) und dreimal aus dem Colon transversum (10%) entnommen. Eine Therapie erhielten 19 Patienten,

von denen alleine 12 Patienten Immunmodulatoren (41%) erhielten. Drei Patienten wurden im Rahmen der akuten Therapie (10%) mit Steroiden behandelt. Je zwei Patienten wurden entweder noch nicht therapiert oder wiesen keine Verbesserung auf die Standardtherapie auf (je 6 %). Über sechs Patienten (20%) ließen sich keine Informationen bezüglich ihrer Therapie sammeln. Im Median litten die Menschen bereits seit 13,5 Jahren (Spannbreite von 0 – 29 Jahren) unter der Erkrankung. Hier fehlten bei 17 Patienten Angaben zum Jahr der Erstdiagnose.

4.1.4 Infektiöse Kolitis

Die letzte Gruppe stellen die infektiösen Kolitiden dar. Diese Gruppe bestand aus aus 13 Patienten, die während der endoskopischen Untersuchung den Eindruck einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung erweckten, von der Pathologie jedoch nicht als solche identifiziert werden konnten. Erst die mikrobiologische Diagnostik lieferte den entscheidenden Befund.

4.1.4.1 Nicht-entzündliche Biopsien bei infektiöser Kolitis

Die gesunden Darmareale stammten dabei von fünf Patienten, von welchen sowohl Biopsien aus entzündeten wie aus gesunden Darmgewebe entnommen wurden. Eine der Patienten war weiblichen (20%), fünf waren männlichen Geschlechtes (80%). Das Alter lag zwischen 35 und 70 Jahren mit einem Median bei 54 Jahren. Drei Proben wurden aus dem Colon transversum (60%), jeweils eine aus dem Rektum und dem Coecum entnommen (je 20%). Auf Grund einer anderen Erkrankung nahm ein Patient Immunmodulatoren ein (20%).

4.1.4.2 Entzündliche Biopsien bei infektiöser Kolitis

Neben den fünf Doppelproben wurden acht weitere Patienten mit infektiöser Kolitis erfasst. Darunter waren sechs Frauen (43%), sowie sieben Männer (54%). Das Erkrankungsalter lag mit einem Median bei 44,5 Jahren mit einer Spannbreite von 27 bis 63 Jahren. Die Entzündungen waren dabei im Sigmoideum (n = 5; 39%), dem Rektum (n = 4; 31%), dem Colon transversum (n = 2; 15%) sowie dem terminalen Ileum (n = 2; 15) lokalisiert. Ein Patient (8%) wurde zu dem Zeitpunkt bereits mit Immunmodulatoren wegen einer anderen Erkrankung behandelt, die anderen 12 Patienten (92%) hatte noch keine Therapie erhalten.

4.1.5 Ausschluss von Konfoundern

Zum Ausschluss von möglichen Störfaktoren wurde eine Korrelationsanalyse unternommen. Hierbei wurden die Einflüsse des Geschlechtes, des Alters, der Er-

krankungsaktivität und -dauer, die Stelle der Biopsieentnahme, der Anzahl der Erkrankungsjahre sowie der Therapie untersucht, welche jedoch keine Zusammenhänge aufzeigte, so dass auf weitere Angaben verzichtet wird. Gleichzeitig wurde auch die Korrelation unter den einzelnen miRNAs auf die einzelnen Gruppen bezogen untersucht. Das Ergebnis zur Analyse bei gesunden Patienten wird an Anhand der *Abbildung 13* veranschaulicht.

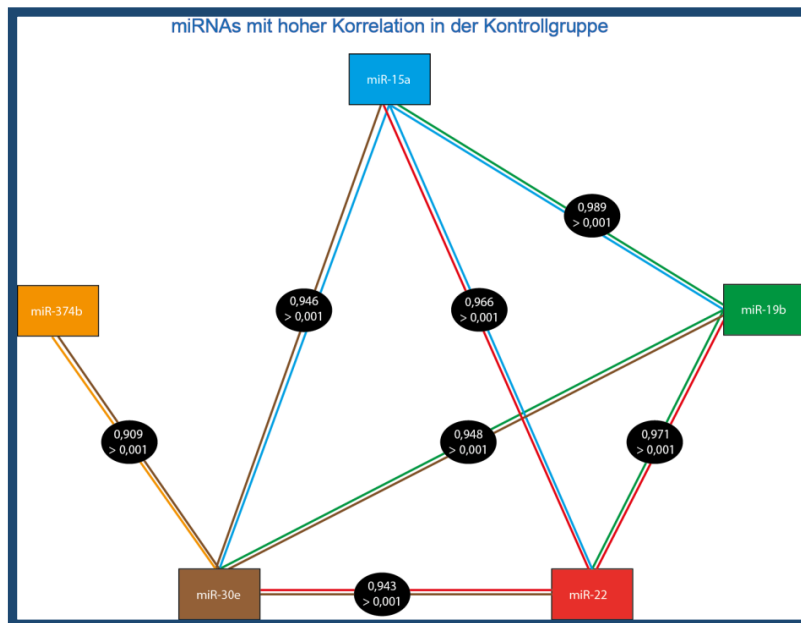


Abbildung 13 Korrelationsuntersuchung der miRNAs in der Kontrollgruppe; Dargestellt wurden alle Korrelationen über 0,90 mit hoher Signifikanz. Die genauen Korrelationen für die einzelnen miRNAs wurden nach Pearson mit ihrem Signifikanzniveau (2-seitig) in den Ellipsen dargestellt. In die Auswertung wurden alle miRNAs unabhängig der Lokalisation oder der Entzündungsaktivität aufgenommen.

In der Gruppe der Patienten mit einem Morbus Crohn konnte eine Beziehung zwischen der miR-18a und miR-424 mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,949 und einem Signifikanzniveau von $< 0,001$ festgestellt werden (nicht dargestellt).

Sieben miRNAs standen im Rahmen einer Colitis ulcerosa miteinander in Beziehung. Dieses wird in *Abbildung 14* dargestellt.

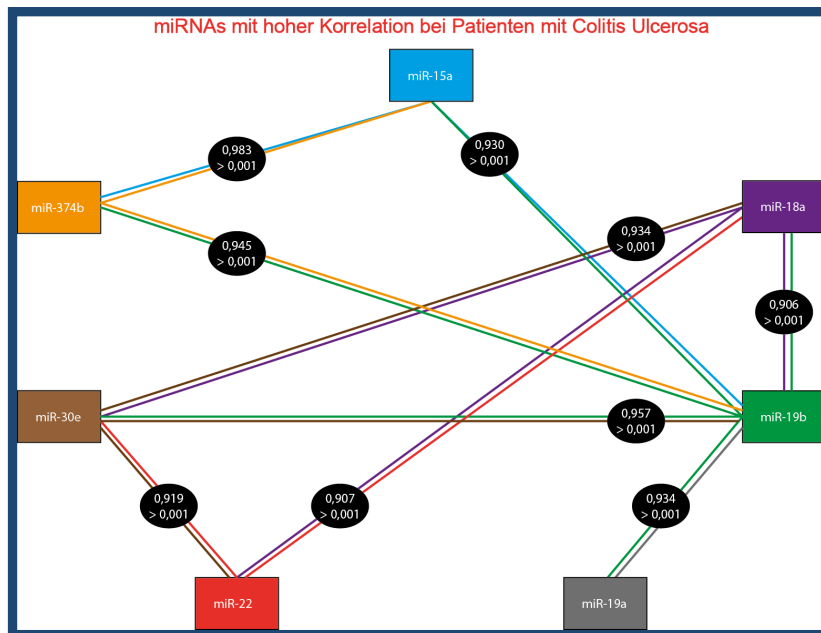


Abbildung 14 Korrelationsuntersuchung der miRNAs bei Patienten mit Colitis ulcerosa; dargestellt wurden alle Korrelationen über 0,90 mit hoher Signifikanz. Die genauen Korrelationen für die einzelnen miRNAs wurden nach Pearson mit ihrem Signifikanzniveau (2-seitig) in den Ellipsen dargestellt. In die Auswertung wurden alle miRNAs unabhängig ihrer Lokalisation oder der Entzündungsaktivität aufgenommen.

4.2 Ergebnisse der MicroArray RT² Pathway Analyse

Der erste Analysezeitpunkt fand mit zwei Proben pro Gruppe und nach 103 gesammelten Biopsien Ende März 2009 statt. Dabei zeigten sich bei 9 miRNAs unter Erkrankung eine deutliche Veränderung im Expressionsverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den Colitis ulcerosa-Patienten wiesen die miR-15a ($p = 0,025$), miR-18a ($p = 0,022$), miR-101 ($p = 0,031$) und miR-374b ($p = 0,055$) deutliche Veränderung auf, bei den Morbus Crohn-Patienten die miR-19a ($p = 0,024$) und die miR-141 ($p = 0,05$). Sowohl bei Colitis ulcerosa als auch Morbus Crohn waren die miR-19b ($p = 0,036$ für Morbus Crohn, $p = 0,049$ für Colitis ulcerosa) als auch miR-30e ($p = 0,042$ für Morbus Crohn, $p = 0,004$ für Colitis ulcerosa) verändert. Zusätzlich wurden die miR-22 ($p = 0,098$) und die miR-185 ($p = 0,088$) auf Grund ihrer Tendenz auf veränderte Expression bei der Erkrankung Morbus Crohn mit berücksichtigt.

In der zweiten Analyse (*Abbildung 15 A*) wurden die Daten der ersten Analyse um jeweils einen weiteren Patienten pro Gruppe ergänzt und konnte somit bei voller Ausnutzung des Systems mit 9 Patienten (drei Patienten pro Gruppe, nach 142 Proben) Anfang Juni 2009 durchgeführt werden. Anzumerken ist jedoch, dass das internetgestützte Auswertungssystem der Firma SABiosciences die dritte miRNA-Array Analyse im Falle von Morbus Crohn auf Grund einer positiven PCR Kontrolle (PPC) als Hinweis für ein Problem während des PCR-Zyklus ausgeschlossen hat.

Die *Abbildung 15 B* stellt einen Auszug der wichtigsten Ergebnisse des miArray-Analysesystems dar. Dabei wird deutlich, dass sich die Anzahl an Hinweisen auf eine Veränderung des Expressionsverhaltens der miRNAs im Bereich von Colitis ulcerosa von anfänglich 6 miRNAs auf die let-7d ($p = 0,033$) sowie die miR-185 ($p = 0,016$) präzisiert hat. Beide miRNAs zeigten sich dabei im Vergleich zur Kontrollgruppe als deutlich supprimiert. So war die nun erstmalig veränderte let-7d um das 3,1fache und die miR-185 um das 4,6fache vermindert exprimiert.

Bedingt durch den Ausschluss der dritten Probe bei Morbus Crohn kam es hierbei zu keiner Veränderung der in der ersten Analyse erhobenen p-Werte. Auffällig war, dass alle deutlich veränderten miRNAs in Form von den miR-19a, miR-19b, miR-30e sowie miR-141 eine Hochregulierung in ihrem Expressionsverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichneten. Anders verhielt es sich bei der miR-185. Diese miRNA zeigte eine Suppression im Expressionsverhalten um den Faktor 2,3.

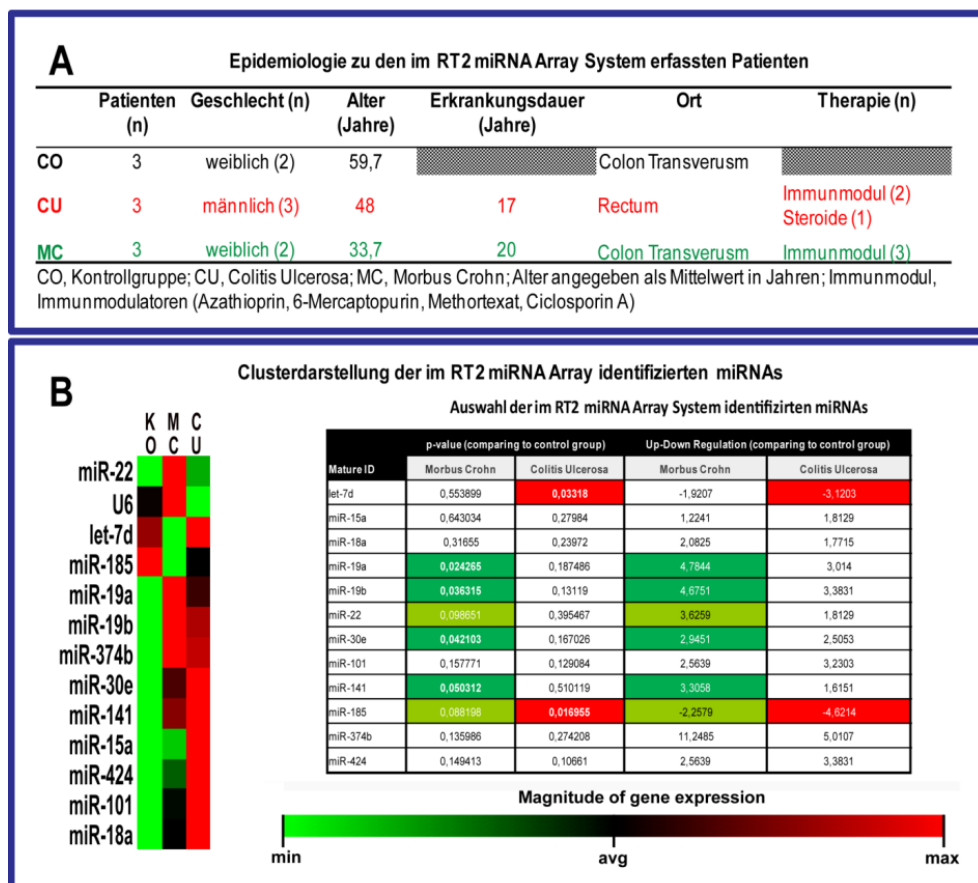


Abbildung 15 A und B: Ergebnisse der miArray Analyse (Stand: 01.11.2009)

Abbildung A: Epidemiologische Darstellung der im RT2 miRNA Array System erfassten Patienten

Abbildung B: Clusterdarstellung und statistische Auswertung der im RT2 miRNA Array System identifizierten miRNAs; im linken Bildbereich von Abschnitt B wird die Expression der unterschiedlichen miRNAs farblich als Cluster hervorgehoben. Dabei stellt eine grüne Einfärbung eine niedrige Genexpression dar, wohingegen die kräftige rote Farbe für eine hohe Genexpression steht (vgl. hierzu die Farbskala mit dem Titel „Magnitude of gene expression“). In der Tabelle werden die p-Werte für die beiden entzündlichen Darmer-

krankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa auf der linken Tabellenseite gezeigt, auf der rechten erfolgt eine Darstellung der Expressionsrichtung der entsprechenden miRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als ein signifikanter Hinweis wurden p-Werte $\leq 0,05$ bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 5\%$ gewertet (dunkelgrün für Morbus Crohn, rot für Colitis ulcerosa). P-Werte mit einer Tendenz ($p \leq 0,1$) für eine Veränderung des Expressionsverhaltens wurden hellgrün hervorgehoben.

4.3 Untersuchung des Expressionsverhaltens der miRNAs im Gewebe des selben Patienten (Verbundene Analyse)

4.3.1 Vergleich von entzündetem zu gesundem Kolongewebe bei Patienten mit Morbus Crohn

In dieser Analyse (vgl. auch *Abbildung 16-A*) wurden 8 Patienten einbezogen, von welchen jeweils eine gesunde sowie eine erkrankte Darmbiopsie entnommen wurde. Unter diesen 8 Patienten waren 2 Frauen und 6 Männer. Das mediane Alter lag bei 47 Jahren mit einer Spannweite von 27 bis 54 Jahren. Die Patienten waren im Median schon seit 18 Jahren an Morbus Crohn erkrankt (Spannweite 0 – 30 Jahre) und wurden mit Immunmodulatoren ($n = 4$) oder Biologics ($n = 4$) therapiert.

Einen ersten Hinweis auf das Expressionsverhalten der einzelnen miRNAs erlangt man durch die Betrachtung von Differenzenboxplots (vgl. *Abbildung 16-B*), welche aus der Subtraktion der gesunden Werte von den entzündeten Werten gebildet wurden. Hieraus geht hervor, dass bei der Hälfte der Patienten für die miRNAs miR-30e, miR-185 und miR-424 im Vergleich von gesunden zu entzündetem Gewebe kein Unterschied im Expressionsverhalten der miRNA vorlag. Einzig bei der miR-374b lag bei 50% der Patienten eine reduzierte Expression dieser miRNA im entzündeten Gewebe vor. Die miRNAs let-7d, miR-15a, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-22, miR-101 und miR-141 wiesen hingegen bei über der Hälfte der Patienten eine Steigerung im Expressionsgrad innerhalb von entzündlichen Biopsien auf.

Die Überprüfung an Hand von statistischen Testes erfolgte gemäß der symmetrischen Verteilung mit einem t-Test für verbundene Stichproben oder dem Vorzeichenstest. Die miRNAs let-7d, miR-15a, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-22 sowie miR-424 konnten an Hand des verbundenen t-Testes auf signifikante Tendenzen untersucht werden. Das Ergebnis der Analyse zeigt deutliche Tendenzen für eine Veränderung des relativen miRNAs Gehaltes in entzündetem Kolongewebe von Morbus Crohn-Patienten für die miRNAs let-7d ($p = 0,009$), miR-15a ($p = 0,018$) sowie die miR-22 ($p = 0,002$). Dabei wurde bei der miR-22 ein um das 3,9fache höherer Expressionsgrad im entzündeten Gewebe im Vergleich zum gesunden

Gewebe festgestellt. Bei der miRNA let-7d lag ein 1,9facher, bei der miR-15a ein um das 3,5facher höherer Gehalt an miRNA im entzündeten Gewebe vor.

Bei fehlender Normalverteilung wurde der Vorzeichen-Test angewendet. Hierbei ließen sich unter der Annahme eines $p \leq 0,05$ keine Indikatoren für signifikante Tendenzen ermitteln. Dennoch zeichnen sich bei den miR-30e sowie miR-141 mit einem p-Wert = 0,07 Hinweise für eine Relevanz ab.

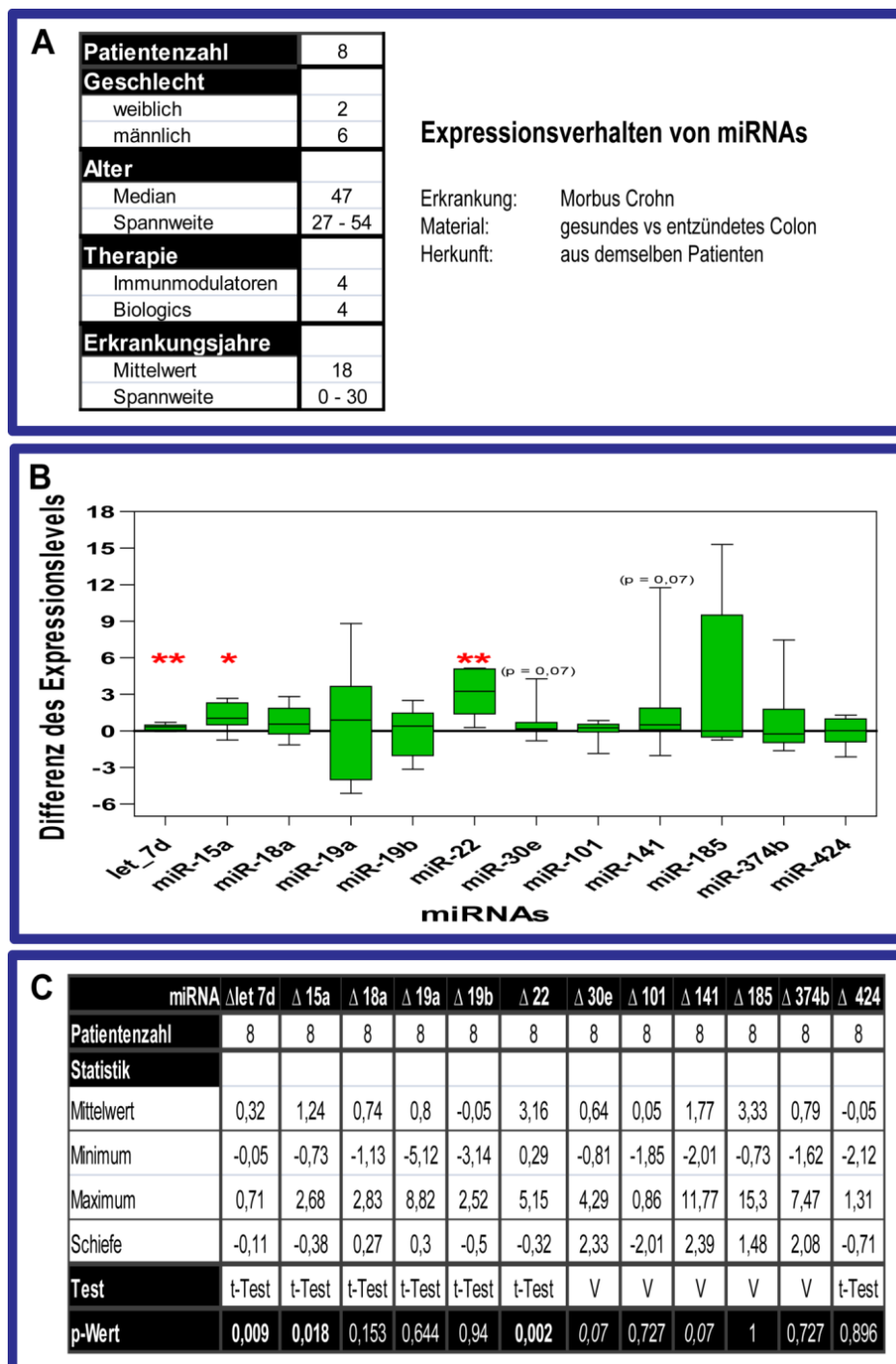


Abbildung 16 A – C: Untersuchung des Expressionsverhaltens von miRNAs im gesunden und entzündetem Dickdarmgewebe innerhalb eines Patienten bei Morbus Crohn

Abschnitt A: Epidemiologischer Überblick zu den untersuchten acht Patienten; von jedem Patienten wurden sowohl eine Biopsie aus dem entzündeten, sowie eine aus dem gesunden Dickdarm entnommen.

Abschnitt B: Differenzboxplots der miRNA Expressionslevels; der mittlere Balken innerhalb eines Boxplots stellt die 50-Perzentile dar. Bei Normalverteilung kam der verbundene t-Test zur Anwendung, ansonsten der Vorzeichentest. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$

Abschnitt C: Deskriptive Darstellung der einzelnen miRNA-Differenzen (Δ) aus entzündetem zu gesundem Kolongewebe von Morbus Crohn-Patienten; die Entscheidung zur Testvariante fiel gemäß der Schiefe. Normalverteilung lag dabei bei einer Schiefe = [-1;1] vor und führte zur Testung mittels des verbundenen t-Test (t-Test). Bei fehlender Normalverteilung erfolgte die Testung mittels Vorzeichentest (V).

Die im Rahmen dieser Untersuchung gewählten Biopsieorte werden in der *Tabelle 25* dargestellt:

Patient	Entnahmeort der gesunden Biopsie	Entnahmeort der entzündlichen Biopsie
Patient 1	Transversum	Colon descendens
Patient 2	Colon descendens	Colon ascendens
Patient 3	Colon descendens	Colon transversum
Patient 4	Colon descendens	Colon transversum
Patientin 5	Colon transversum	Sigmoideum
Patient 6	Rektum	Sigmoideum
Patient 7	Rektum	Sigmoideum
Patientin 8	Rektum	Colon transversum

Tabelle 25 Im Rahmen der verbundenen Analyse gewählte Biopsieorte bei 8 Morbus Crohn Patienten

4.3.2 Vergleich von entzündetem zu gesundem Kolongewebe desselben Patienten bei Colitis ulcerosa

Die relative Expressionsanalyse der miRNA im Krankheitsgeschehen der Colitis ulcerosa wurde bei 12 Patienten durchgeführt. Dabei wurde auf Grund des typischen Befallsmusters des Kolons auf eine Unterscheidung zwischen Dünn- und Dickdarm verzichtet, so dass nur Proben, welche aus dem Dickdarm stammten berücksichtigt wurden. 10 Doppelproben stammten von Männern, zwei von Frauen.

Die *Abbildung 17 A* veranschaulicht die Verteilung der Patienten mit Colitis ulcerosa, von denen pro Patient jeweils eine Biopsie aus dem gesunden sowie eine Biopsie aus dem erkrankten Dickdarm entnommen wurde. Die Patienten waren im Median 51,5 Jahre alt und setzten sich aus einer Patientengruppe zwischen 20 und 61 Jahren zusammen. Die Therapie bestand bei fünf Patienten aus Immunmodulatoren. Mesalamine (n = 1), Antibiotika (n = 1), Biologics (n = 1) und die Steroid-Stoß-Therapie (n = 1) stellten weitere Therapien dar, die bei Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung durchgeführt wurden. Bei zwei Patienten war die Therapie unbekannt. Eine Therapieresistenz war zum Zeitpunkt der Untersuchung von

einem Patienten bekannt. Die Erkrankungsjahre lagen im Median bei 13,5 Jahren und variierten zwischen 1 und 29 Jahren.

Die kumulierte Darstellung der Differenzenboxplots gebildet aus der Subtraktion der gesunden Werte von den entzündeten Werten in *Abbildung 17 B* veranschaulicht die Verteilung der Messergebnisse für die einzelnen miRNAs der Colitis ulcerosa Patienten. Erneut repräsentiert der Plot die erste Perzentile am unteren, die zweite Perzentile mit dem mittleren, dicken sowie die dritte Perzentile mit dem obersten Balken. Ausreißer werden als Punkte dargestellt. Deutlich wird hierbei eine Tendenz zu negativen Werten.

Die deskriptive Darstellung erfolgte unter Beachtung der Normalverteilung. In der *Abbildung 17 C* werden dabei neben den Mittelwerten das Maximum und Minimum der erzielten miRNA Expressionen aufgeführt. Da es bei der Analyse der miRNAs miR-15a, miR-19a, miR-19b, miR-101, miR-374b und miR-424 zu einem technischen Problem in Form einer Verunreinigung kam, konnten hier jeweils nur 11 Biopsien untersucht werden. Besonders auffällig ist dabei die deutliche Tendenz zu niedrigen bis negativen Mittelwerten bei den analysierten Colitis ulcerosa Patienten (Mittelwert zwischen 14,98 und -22,53).

Die Signifikanz der Differenzen der miRNAs let-7d, miR-15a, miR-18a, miR-30e, miR-141 und miR-424 wurden an Hand des verbundenen t-Testes untersucht. Jedoch ergaben sich unter der Annahme eines α -Fehlers von 5% weder signifikante Hinweise noch Tendenzen für eine Änderung des Expressionsverhaltens dieser miRNAs im Rahmen einer Colitis ulcerosa.

Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Untersuchung der nicht normalverteilten miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-22, miR-101, miR-185 sowie miR-374b mit dem Vorzeichen-Test. Auch hier lieferte keine der miRNAs unter der Annahme eines α -Fehlers von 5% einen tendenziellen Hinweis dafür, dass es im gesunden Gewebe Expressionsunterschiede im Vergleich zum entzündeten Gewebe gibt.

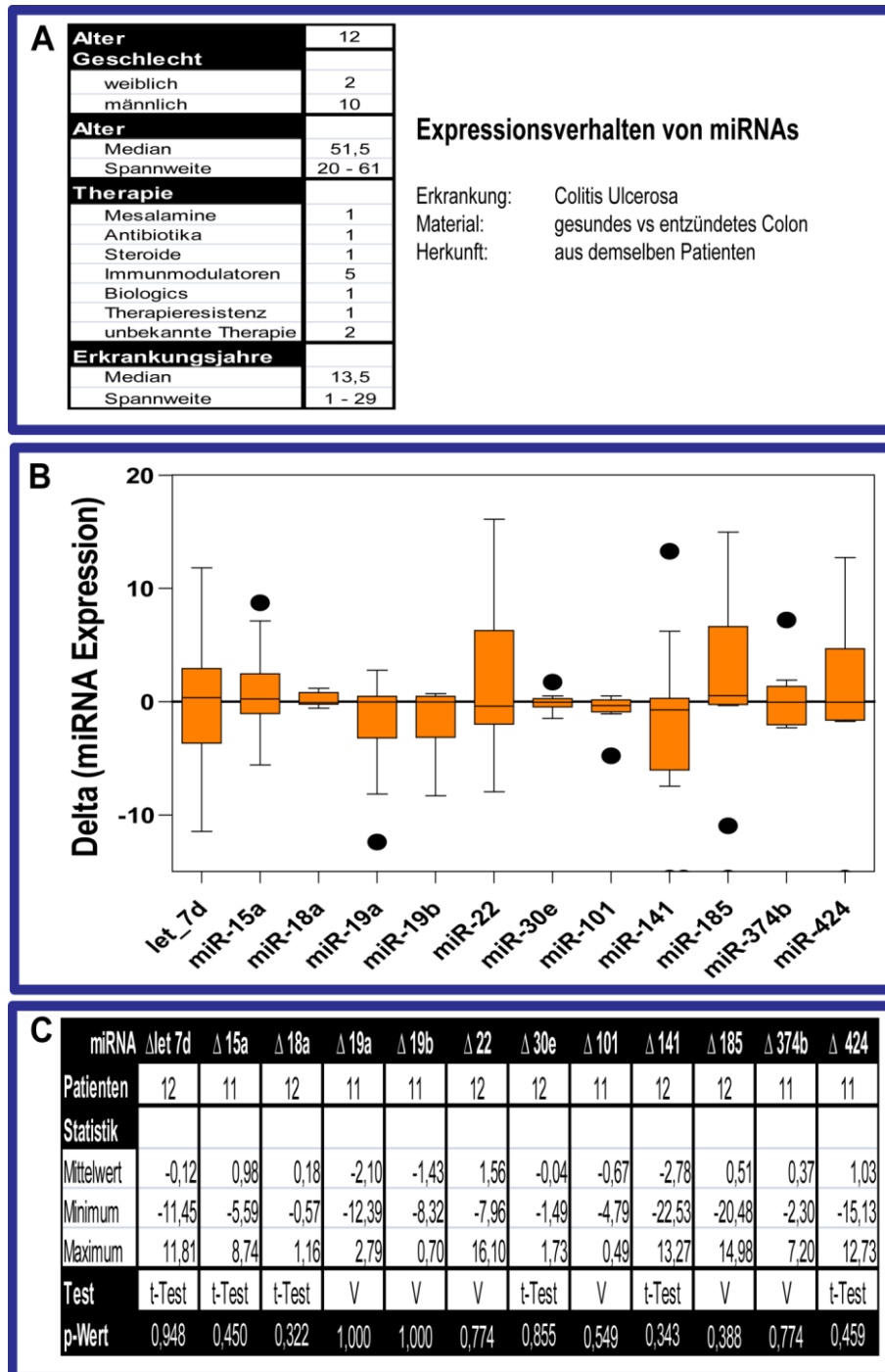


Abbildung 17 A - C: Expressionsverhalten von miRNAs zwischen gesundem und entzündetem Dickdarmgewebe bei Colitis ulcerosa

Abbildung A: Epidemiologische Darstellung der untersuchten 12 Patienten

Abbildung B: Differenzboxplots veranschaulichen die Expression der einzelnen miRNAs bei Patienten mit Colitis ulcerosa; Punkte repräsentieren Ausreißer.

Abbildung C: Deskriptive Darstellung zur durchgeführten Analyse des Expressionsverhaltens; t-Test = verbundener t-Test bei gegebener Normalverteilung, V = Vorzeichentest bei fehlender Normalverteilung

4.4 Untersuchung des Expressionsverhaltens der miRNAs im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe (unverbundene Analyse)

Die Kontrollgruppe setzt sich aus 23 Biopsien zusammen, deren Altersmedian bei 61 Jahren mit einer Spannbreite von 18 bis 82 Jahren lag. 11 Biopsien wurden

Frauen und 12 Männern entnommen. Zum Zeitpunkt der Entnahme waren bei diesen keine Therapien bekannt.

Bei den Erkrankungen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, sowie infektiöse Kolitis wurden bei den Biopsien zwischen nicht-entzündlichem und entzündlichem Gewebe unterschieden. Die Biopsien stammten hierbei von unterschiedlichen Patienten.

Im Folgenden werden besonders die Ergebnisse im Rahmen einer Erkrankung mit Morbus Crohn dargestellt. Die Ergebnisse zu Colitis ulcerosa sowie infektiöse Kolitis folgen an späterer Stelle.

4.4.1 Vergleich der miRNA-Expression von nicht-entzündlichem Kollongewebe zwischen Patienten mit Morbus Crohn und der Kontrollgruppe

Bei Morbus Crohn konnten 12 nicht-entzündliche Proben analysiert werden, von denen 8 Biopsien von männlichen Patienten stammten. Das Alter der untersuchten Personen lag dabei zwischen 23 und 65 Jahren mit einem Median bei 47 Jahren. Die Erkrankungsdauer lag bei bis zu 30 Jahren seit Erstdiagnose mit einem Median bei 16 Jahren. Die Therapien setzten sich aus Mesalaminen ($n = 1$), Immunmodulatoren ($n = 7$) sowie Biologics ($n = 4$) zusammen (vgl. *Abbildung 18-A*). Die Boxplots im Abschnitt B der *Abbildung 18* geben eine Übersicht über das Expressionsverhalten von miRNAs im nicht entzündlichen Dickdarmgewebe. Dabei wird das Expressionsverhalten der miRNAs in der Kontrollgruppe, sowie der zum Zeitpunkt der Untersuchung in Remission befindlichen Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa dargestellt.

Der Abschnitt C der *Abbildung 18* stellt eine deskriptive Darstellung der erhobenen relativen Expressionswerte mit Angaben zu deren Mittelwert, Minimum und Maximum für die einzelnen miRNAs dar. Hierbei wurde ausschließlich nicht-entzündetes Dickdarmgewebe berücksichtigt. In der Kontrollgruppe konnten bei der let-7d ($n = 20$), miR-141 ($n = 22$) sowie miR-424 ($n = 20$) nicht alle der jeweils 23 Biopsien auf Grund von technischen Fehlern berücksichtigt werden. Die Morbus Crohn Gruppe wies keine technischen Fehler auf.

Die Analyse erfolgte auf Grund der fehlenden Normalverteilung mit dem Kruskal-Wallis-Test. Relevante Hinweise ergaben sich dabei zu einem Signifikanzniveau von 5% für die die miR-18a ($p = 0,006$) sowie die miR-185 ($p = 0,009$). Als Hinweise kann man außerdem die miR-15a ($p = 0,085$) sowie die miR-30e ($p = 0,095$) einbeziehen.

Der im Anschluss durchgeführte post-hoc-Test wurde in Form eines Mann-Whitney-Tests durchgeführt. Hierbei wurden die einzelnen Gruppen untereinander verglichen. Deutliche Hinweise für einen signifikanten Unterschied im Expressionsverhalten der miRNAs zwischen Morbus Crohn-Patienten und der Kontrollgruppe ergaben sich hierbei ausschließlich für die miR-18a ($p = 0,007$). Die miR-185 konnte mit einem p-Wert von $p = 0,073$ das Signifikanzniveau von 5% nicht erreichen.

Der Vergleich von Colitis ulcerosa mit Morbus Crohn zeigt keinen signifikanten Unterschied im Expressionsverhalten für die einzelnen miRNAs.

Abbildung 18 A-C: Expressionsverhaltens von miRNAs im nicht entzündlichen Dickdarmgewebe

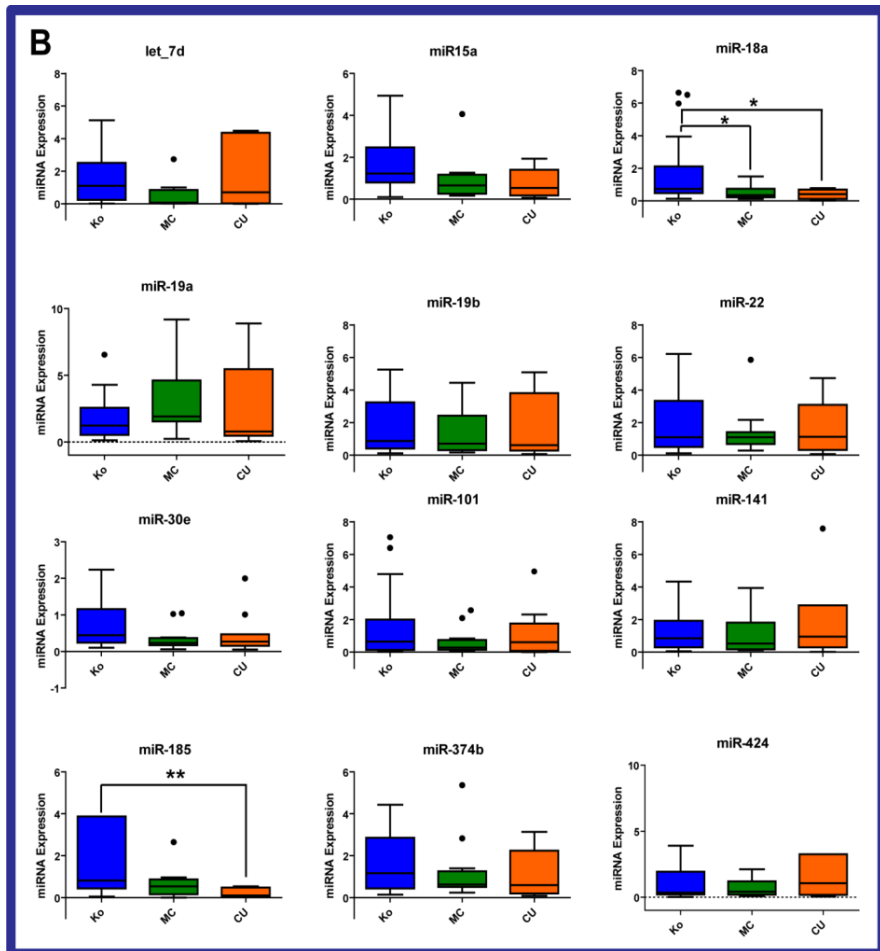
Abschnitt A: Epidemiologische Darstellung der untersuchten Patienten; Ko = Kontrollgruppe, MC = Morbus Crohn Patienten in Remission, CU = Colitis ulcerosa Patienten in Remission

Abschnitt B: Darstellung der miRNA Expression in Form von Boxplots; für jede miRNA wird das Expressionsverhalten getrennt nach Kontrollgruppe (= Ko), Morbus Crohn (= MC) und Colitis ulcerosa (= CU) veranschaulicht. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; Punkte symbolisieren „Ausreißer“.

Abschnitt C: Deskriptive Darstellung zur durchgeführten statistischen Untersuchung; Minimum, Maximum und Mittelwert werden zu den drei untersuchten Gruppen dargestellt. Die statistische Testung wurde mit dem Kruskal-Wallis Test für mehrere unabhängige Stichproben eingeleitet. Bei Erreichen eines Signifikanzniveaus von 5%, erfolgte ein post-hoc Test. Da keine Normalverteilung vorlag, wurde als post-hoc Test der Mann-Whitney-Test angewendet.

A		Ko	MC	CU
	Probenanzahl		23	12
Geschlecht				
weiblich		11	4	2
männlich		12	8	9
Alter				
Median		61	47	51
Spannbreite		18 - 76	23 - 65	20 - 61
Therapie				
keine		23	0	0
Mesalazine		0	1	1
Antibiotika		0	0	1
Steroide		0	0	1
Immunmodulatoren		0	7	4
Biologics		0	4	1
Therapieresistenz		0	0	1
ohne Informationen		0	0	2
Erkrankungsjahre				
Median			16	20
Spannbreite			0 - 30	1 - 29

Expressionsverhalten von miRNAs
 Erkrankung: Ko vs MC vs CU
 Material: nicht entzündetes Kolon
 Herkunft: Kollektiv



C	Gruppe	Untersuchung	p-Werte der miRNAs											
			let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
Kontrolle	Minimum		0,011	0,107	0,130	0,120	0,124	0,116	0,106	0,009	0,055	0,048	0,139	0,015
	Maximum		50,111	24,160	6,641	16,109	28,113	33,999	12,502	10,281	41,772	29,210	21,567	82,503
	Mittelwert		5,766	2,615	1,811	2,278	2,796	3,130	1,358	1,821	4,335	4,068	2,862	10,873
Morbus Crohn	Minimum		0,007	0,170	0,116	0,226	0,170	0,284	0,059	0,021	0,122	0,000	0,238	0,073
	Maximum		9,266	4,068	1,501	15,751	4,450	5,852	1,045	2,569	3,942	2,648	5,368	2,125
	Mittelwert		1,151	0,939	0,496	3,702	1,402	1,426	0,358	0,630	1,069	0,657	1,219	0,683
Colitis Ulcerosa	Minimum		0,002	0,065	0,012	0,063	0,058	0,064	0,051	0,003	0,013	0,063	0,092	0,054
	Maximum		12,128	64,592	0,774	15,456	9,161	4,733	1,996	4,948	25,731	13,826	54,282	73,170
	Mittelwert		2,459	6,508	0,405	3,520	2,124	1,612	0,473	1,106	3,800	1,417	5,738	8,406
nicht entzündet	Kruskal-Wallis		0,134	0,085	0,006	0,343	0,639	0,942	0,095	0,499	0,707	0,009	0,392	0,608
	KO vs MC			0,057	0,007				0,049			0,073		
	MC vs CU			0,976	0,740				0,786			0,169		

4.4.2 Expression im entzündeten Kolongewebe bei Morbus Crohn

Gemäß *Abbildung 19-A* stammten 13 Proben aus entzündlichen Dickdarmarealen von Morbus Crohn-Patienten. Sechs dieser Patienten waren weiblich, 7 waren männlichen Geschlechtes mit einem Altersmedian von 43 Jahren (Spannbreite 17 – 54 Jahre). Die Erkrankungsdauer lag bei bis zu 30 Jahren (Median: 10 Jahre). Immunmodulatoren kamen bei sechs, Biologics bei vier Patienten zum Einsatz. Zwei Patienten stellten Erstdiagnosen dar und hatten noch keine Therapie zum Diagnosezeitpunkt, bei einem weiteren lagen keine Informationen zum Zeitpunkt der Untersuchung vor.

Die Deskription für die entzündlichen Dickdarmbiopsien erfolgt in *Abbildung 19-C*. Dargestellt werden neben der untersuchten Probenanzahl der Mittelwert, Minimum und Maximum für die einzelnen analysierten miRNAs pro Gruppe. In der Kontrollgruppe konnten bis auf die let-7d (n = 20) sowie die miR-141 (n = 22) alle 23 Biopsien pro miRNA analysiert werden. Auch bei den entzündlichen Biopsien aus dem Dickdarmgewebe von Morbus Crohn (n = 13), sowie den Colitis Ulcerosa-Patienten (n = 23) konnten alle Biopsien berücksichtigt werden. Von den ursprünglich sechs Proben der Patienten mit einer infektiösen Kolitis blieben bei den miRNAs let-7d, miR-141, sowie miR-185 nur jeweils zwei Proben übrig. Aus diesem Grund wurde wegen der geringen Aussagekraft auf die Berücksichtigung der einzelnen Werte bei der statistischen Auswertung verzichtet.

Ausgewertet wurde bei fehlender Normalverteilung mit dem Kruskal-Wallis-Test zu einem angenommenen Signifikanzniveau von 5%. Dabei ergaben sich deutliche Hinweise auf einen Unterschied im Expressionsverhalten der einzelnen miRNAs zwischen den einzelnen Gruppen für die let-7d (p = 0,002), die miR-185 (p = 0,054), die miR-374b (p = 0,043) sowie die miR-424 (p = 0,033). Der post-hoc-Test erfolgte an Hand des Mann-Whitney-U Testes für diese miRNAs. Hinweise auf Unterschiede zeigten sich besonders bei der let-7d. Der deutlichste Unterschied lag dabei im Vergleich von Morbus Crohn mit Colitis ulcerosa mit einem p-Wert <0,001. Auch zwischen der Kontrollgruppe und den Morbus Crohn-Patienten (p = 0,08) bestanden Unterschiede. Bei den miRNAs miR-185 (p = 0,022), miR-374b (p = 0,04) sowie der miR-424 (p = 0,001) ergaben sich im Vergleich von Morbus Crohn mit Colitis ulcerosa deutliche Hinweise auf Abweichungen im Expressionsverhalten. Zusätzlich wies die miR-374b (p = 0,065) bei den entzündli-

chen Dickdärmen deutlich niedrigere Werte für das relative Expressionsverhalten der Morbus Crohn-Patienten auf als bei den Kontrollen.

Zusätzlich wurde noch eine gesonderte Analyse durchgeführt, bei der die miRNA-Expression zwischen entzündetem Gewebe aus dem Bereich des Colon transversum bei Morbus Crohn (n = 6) mit gesundem Gewebe aus dem Colon transversum (n = 20) verglichen wurde (nicht dargestellt). Anlass dafür war eine zum Zeitpunkt der Probensammlung und Probenauswertung noch nicht bekannte Publikation von Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, et al. in Ende 2010, welche die differenzierte miRNA-Expression in unterschiedlichen Darmabschnitten des Kolons beschrieb (252). Getestet wurde bei bestehender fehlender Normalverteilung zum Signifikanzniveau von $p = 0,05$ und einem Konfidenzintervall von 95% mit dem Mann-Whitney-U-Test. Dabei erwies sich lediglich let-7d mit einem p-Wert von $p = 0,014$ im Rahmen der Entzündung als signifikant verändert. Auf Grund der Gruppengrößen stellt sich eine weiterführende differenzierte Testung aller einzelnen Kolonabschnitte als nicht sinnvoll dar, so dass darauf verzichtet wurde.

Abbildung 19 A-C: Expressionsverhalten von miRNAs im Dickdarmgewebe bei entzündlicher Erkrankung (MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa) im Vergleich zu den nicht entzündlichen Dickdarmbiopsien der Kontrollgruppe (Ko).

Abbildung A: Epidemiologische Darstellung des erfassten Kollektives

Abbildung B: Graphische Darstellung des Expressionsverhaltens von miRNAs in Form von Boxplots; pro miRNA erfolgt die Darstellung der miRNA-Expression in der Kontroll- (Ko), Morbus Crohn- (MC), Colitis ulcerosa- (CU) und der infektiösen Kolitis- (IC) Gruppe. Bei den miRNAs let-7d, miR-141 und miR-185 wurde keine graphische Darstellung der Expression und eine statistische Auswertung für die infektiöse Kolitis-Gruppe auf Grund von unzureichend validen Proben (n = 2) erstellt.

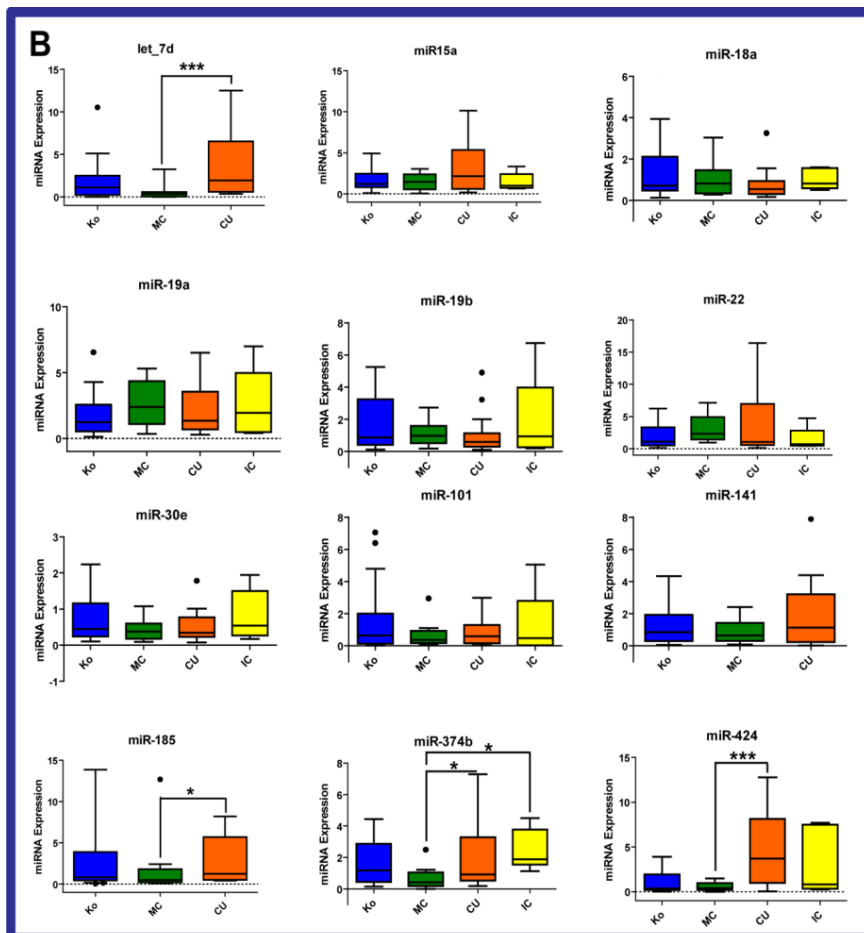
Abbildung C: Statistische Auswertung der erhobenen Ergebnisse; Vortest: Kruskal-Wallis, post-hoc Test: Mann-Whitney-U-Test. Signifikanzniveau 5%; bei den geschwärzten Feldern wurde keine Testung durchgeführt.

A

	KO	MC	CU	IC
Probenanzahl	23	13	23	6
Geschlecht				
weiblich	11	6	7	2
männlich	12	7	16	4
Alter				
Median	61	43	50	66
Spannbreite	18 - 82	17 - 54	20 - 75	31 - 83
Therapie				
keine	23	2	1	5
Mesalamine	0	0	1	0
Antibiotika	0	0	1	1
Steroide	0	0	2	0
Immunmodulatoren	0	6	11	0
Biologics	0	4	2	0
Therapieresistenz	0	0	2	0
ohne Informationen	0	1	3	0
Erkrankungsjahre				
Median		10	20	
Spannbreite		0 - 30	0 - 29	

Expressionsverhalten von miRNAs

Erkrankung: Ko vs MC vs CU vs IC
 Material: entzündetes Kolon
 Herkunft: Kollektiv



C

	let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
Kontrollen (n)	20	23	23	23	23	23	23	23	23	22	23	23
Median	1,11	1,22	0,72	1,24	0,87	1,10	0,45	0,64	0,84	0,82	1,17	0,35
Minimum	0,01	0,11	0,13	0,12	0,12	0,12	0,11	0,01	0,06	0,05	0,14	0,01
Maximum	10,52	24,16	6,64	16,11	28,11	34,00	12,50	10,28	23,67	29,21	21,57	22,41
Morbus Crohn (n)	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Median	0,34	1,46	0,81	2,40	0,98	2,31	0,38	0,35	0,64	0,51	0,41	0,41
Minimum	0,01	0,08	0,28	0,34	0,18	0,95	0,10	0,07	0,09	0,10	0,00	0,00
Maximum	3,25	3,04	3,03	10,39	2,73	7,12	4,47	2,95	12,71	17,95	8,09	1,49
Colitis Ulcerosa (n)	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Median	1,94	2,22	0,55	1,39	0,76	1,13	0,37	0,67	1,13	1,24	0,99	3,81
Minimum	0,37	0,19	0,17	0,26	0,10	0,12	0,08	0,02	0,01	0,44	0,18	0,04
Maximum	12,52	61,51	24,02	40,79	39,63	59,20	66,78	3,37	18,84	24,43	62,49	21,57
Infektiöse Kollitis (n)	2	6	6	6	6	6	6	6	2	2	6	6
Median	1,16	1,25	0,82	2,45	1,07	0,79	0,54	0,51	0,80	1,51	1,88	4,06
Minimum	0,34	0,67	0,51	0,41	0,19	0,42	0,17	0,03	0,43	0,85	1,12	0,25
Maximum	1,97	26,76	1,60	41,11	10,55	24,80	1,95	7,56	1,16	2,18	4,50	9,66
Kruskal-Wallis												
exakte Signifikanz	0,002	0,452	0,293	0,397	0,533	0,214	0,623	0,734	0,814	0,054	0,043	0,033
Post-Hoc-Test												
p-Wert (Ko vs MC)	0,080									0,312	0,065	0,159
p-Wert (MC vs CU)	< 0,001									0,022	0,040	0,001
p-Wert (MC vs IC)											0,012	0,072

4.4.3 Expressionsverhalten der miRNAs im Bereich des terminalen Ileums bei Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zur Kontrollgruppe

Insgesamt konnten fünf gesunde Kontrollen des terminalen Ileums gewonnen und analysiert werden. Diese Biopsien stammen von vier Frauen und einem Mann, welche zwischen 21 und 72 Jahren alt waren (Median: 48 Jahre). Die Kontrollen wurden mit Gewebe des terminalen Ileums von Patienten mit bereits bekanntem Morbus Crohn verglichen. Dabei bestand die Gruppe der Morbus Crohn Patienten aus einer mit gesundem Gewebe (n = 2 Patienten) sowie aus einer Gruppe mit florider Entzündung im Bereich des terminalen Ileums (n = 11 Patienten). Auf Grund der zu kleinen Gruppengröße von 2 Personen, wurde auf eine ausführliche Untersuchung der miRNA Expression unter Remissionsbedingungen verzichtet. Die Gruppe mit dem aktivierten Gewebe setzte sich aus fünf Frauen sowie sechs Männern mit einer Altersverteilung zwischen 21 und 65 Jahren zusammen (Median: 35 Jahre). Mesalamine (n = 4), Immunmodulatoren (n = 6) sowie Biologics (n = 1) kamen als Therapie bei diesen zur Anwendung. Das mittlere Erkrankungsalter lag im Median bei 16,5 Jahren, wobei bei 5 Patienten nähere Angaben dazu fehlten.

Sowohl die Kontrollgruppe mit Biopsien aus gesundem als auch die Morbus Crohn-Gruppe mit Biopsien aus entzündetem Gewebe des terminalen Ileums werden unter den Gesichtspunkten des Mittelwerts, Minimums und Maximums in der *Abbildung 20-C* beschrieben. Dabei konnte mit Ausnahme der let-7d (n = 4) alle fünf Biopsien in der Kontrollgruppe analysiert werden. In der Morbus Crohn Gruppe mussten bei der miR-185 vier Biopsien aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Die statistische Auswertung erfolgt unter Berücksichtigung der Normalverteilung. Dabei wies die miR-185 als einzige miRNA in dieser Auswertung mit einer Schiefe von 0,84 eine Normalverteilung auf, so dass der t-Test für unabhängige Stichproben unter Berücksichtigung des Levene-Tests angewendet werden konnte. Der Levene-Test gibt hierbei erneut eine Aussage über die Varianzgleichheit, welche unter der Annahme eines p-Wert $\leq 0,10$ angenommen wird (Homoskedastizität). Für die übrigen miRNAs erfolgte die statistische Auswertung bei fehlender Normalverteilung über den Mann-Whitney-U-Test. Die miRNAs let-7d, miR-15a, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-22, miR-30e, miR-101 sowie miR-141 wurden mit dem Mann-Whitney Test untersucht. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede auf ein verändertes relatives Expressionsverhalten im entzündeten Gewebe des terminalen Ileums von Morbus Crohn Patienten im Vergleich zu

dem gesunden Korrelat der Kontrollgruppe. Deutliche Hinweise auf einen Unterschied im Expressionsverhalten zeichneten sich bei der in der Varianz homogen auftretenden miR-185 (Levene-Test: $p = 0,034$) mit einem p-Wert von $p = 0,005$ im t-Test, sowie bei der nicht-normalverteilten miR-424 mit einem p-Wert von $p = 0,013$ im Mann-Whitney-U Test ab. Ein weiterer Hinweis auf eine veränderte Expression weist die miR-374b mit einem p-Wert = $0,052$ auf.

Abbildung 20 A-C: Expressionsverhalten von miRNAs im terminalen Ileum

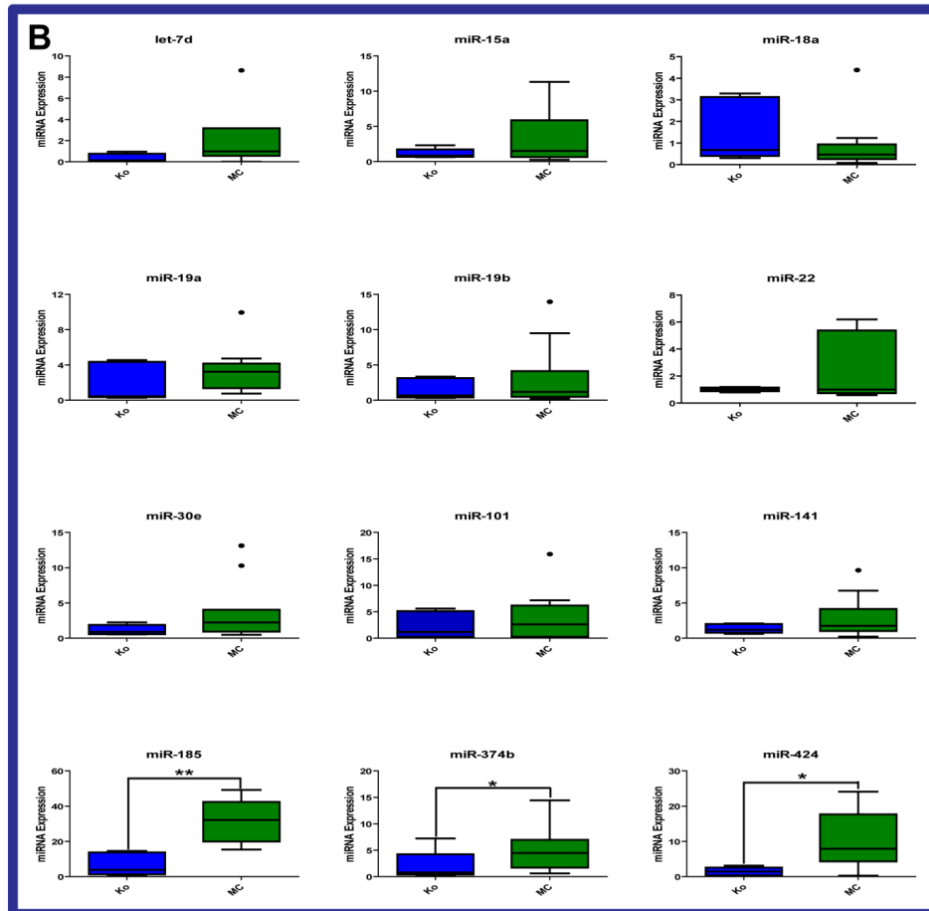
Abbildung A: Epidemiologische Darstellung des untersuchten Kollektives

Abbildung B: Expression der miRNAs dargestellt in Form von Boxplots; Punkte symbolisieren Ausreißer; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,005$, *** = $p \leq 0,001$

Abbildung C: Deskriptive Darstellung zur durchgeführten statistischen Analyse; der Levene-Test gibt eine Aussage über die Varianzgleichheit. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,10$ wurde von einer gleichen Varianzenverteilung ausgegangen.

A	Expressionsverhalten von miRNAs	
	Kontrollen	Morbus Crohn
Probenanzahl	5	11
Geschlecht		
weiblich	4	5
männlich	1	6
Alter		
Median	48	35
Spannbreite	21 - 72	21 - 65
Therapie		
keine	5	0
Mesalamine	0	4
Immunmodulatoren	0	6
Biologics	0	1
ohne Informationen	0	0
Erkrankungsjahre		
Median		16,5
Spannbreite		4 - 25
fehlende Angaben		5

Erkrankung: Morbus Crohn vs Kontrolle
 Material: entzündetes Terminales Ileum
 Herkunft: Kollektiv



C		let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
Kontrollen (n)		4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Median		0,14	0,84	0,68	0,45	0,68	1,03	0,91	1,20	1,20	3,87	0,79	1,46
Minimum		0,09	0,64	0,30	0,30	0,34	0,79	0,56	0,14	0,62	0,47	0,28	0,30
Maximum		0,96	2,31	3,29	4,56	3,34	1,19	2,25	5,62	2,11	14,56	7,23	3,12
Morbus Crohn (n)		11	11	11	11	11	11	11	11	11	7	11	11
Median		0,98	1,52	0,46	3,37	1,19	1,12	2,24	2,62	1,75	19,99	5,08	9,19
Minimum		0,00	0,27	0,08	0,74	0,23	0,58	0,48	0,22	0,23	0,47	0,60	0,29
Maximum		8,63	11,33	4,38	50,45	13,95	22,64	13,12	15,88	9,63	76,29	22,77	48,22
Testentscheidung		MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW	MW	t-Test	MW	MW
Mann-Whitney-U		0,177	0,441	0,377	0,145	0,583	0,743	0,090	0,583	0,510		0,052	0,013
Levene-Test											0,034		
t-Test (pooled)											0,005		

4.4.4 Vergleich der miRNA-Expression von nicht-entzündlichem Kolongewebe zwischen Patienten mit Colitis ulcerosa und der Kontrollgruppe

Die Gruppe mit dem nicht-entzündeten Gewebe bei Patienten mit Colitis ulcerosa besteht aus 11 Biopsien von zwei Frauen und neun Männern. Das Alter variierte dabei zwischen 20 bis zu 61 Jahren mit einem Median bei 51 Jahren. Jeweils ein Patient wurde mit Mesalaminen, Steroiden, Antibiotika, oder Biologics behandelt. Vier Patienten erhielten Immunmodulatoren. Bei zwei Patienten fand zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Therapie statt, ein Patient erwies sich bereits als Non-Responder auf die verabreichten Medikamente. Im Median waren die Patienten bereits seit 20 Jahren erkrankt (Spannbreite 1 bis 29 Jahre). Auf Grund der zu kleinen Gruppengröße von Patienten mit einer infektiösen Colitis ($n = 3$), wurde diese nicht berücksichtigt.

Die *Abbildung 21 C* stellt eine deskriptive Darstellung der erhobenen relativen Expressionswerte mit Angaben zu deren Mittelwert, Minimum und Maximum für die einzelnen miRNAs dar. Hierbei wurde ausschließlich nicht-entzündetes Dickdarmgewebe berücksichtigt. In der Kontrollgruppe konnten bei der let-7d ($n = 20$), miR-141 ($n = 22$) sowie der miR-424 ($n = 20$) nicht alle der jeweils 23 Biopsien auf Grund von Messfehlern berücksichtigt werden. Auch in der Colitis ulcerosa Gruppe stellten sich drei Werte als Messartefakte heraus (jeweils ein Wert bei der miR-19a, 19b, sowie der miR-101) und wurden somit ausgeschlossen. Die Analyse erfolgte auf Grund der weitgehend fehlenden Normalverteilung mit dem Kruskal-Wallis-Test. Relevante Hinweise ergaben sich dabei zu einem Signifikanzniveau von 5% für die miR-18a ($p = 0,006$) sowie die miR-185 ($p = 0,009$). Als Hinweise, welche jedoch das Signifikanzniveau verfehlt haben, kann man außerdem die miR-15a ($p = 0,085$) sowie die miR-30e ($p = 0,095$) erachten. Anschließend erfolgte für diese miRNAs eine zweite statistische Analyse mit dem Mann-Whitney-U-Test. Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Colitis ulcerosa bestätigt die Unterschiede für die miR-18a ($p = 0,009$) sowie die miR-185 ($p = 0,003$). Der Vergleich von Colitis ulcerosa mit Morbus Crohn zeigt keinen signifikanten Unterschied im Expressionsverhalten für die einzelnen miRNAs.

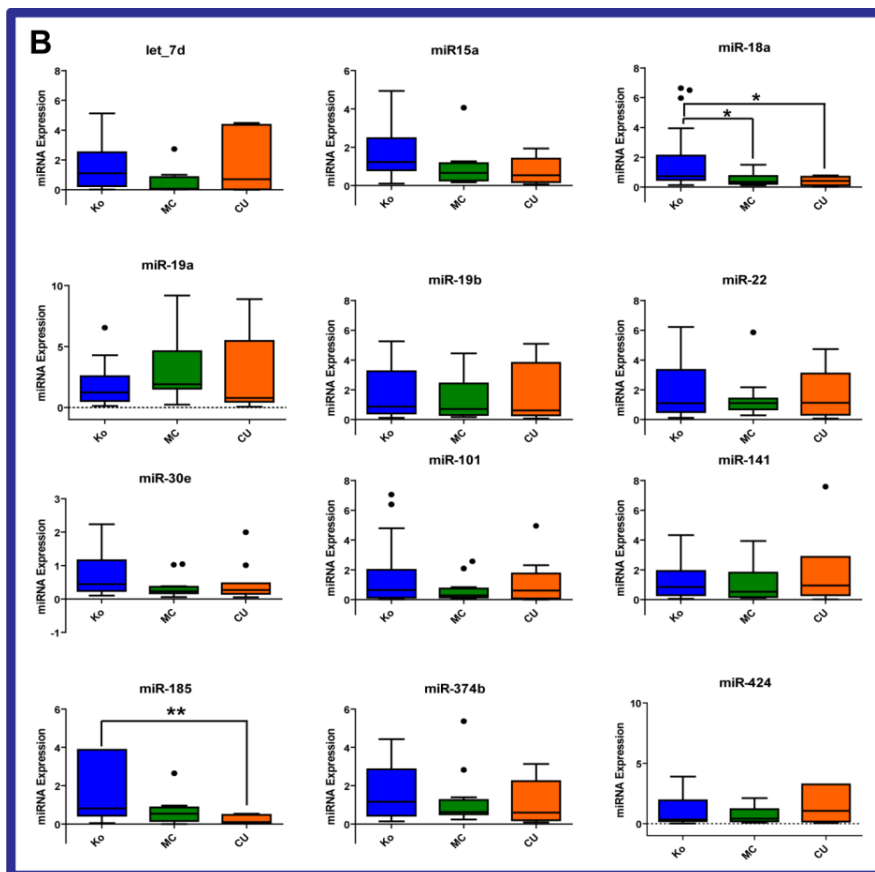
Abbildung 21 A-C: Expressionsverhalten der miRNAs im gesunden Dickdarmgewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zum Kontroll- und Morbus Crohn-Kollektiv

Abbildung A: Epidemiologische Präsentation der untersuchten Gruppen; Ko = Kontrollgruppe, CU = Colitis ulcerosa, MC = Morbus Crohn. Die Darstellung der Infektiösen Kolitis ($n = 3$) wurde auf Grund der zu kleinen Gruppengröße unterlassen.

Abbildung B: Wiedergabe des Expressionsverhaltens an Hand von Boxplots; Statistische Auswertung an Hand eines Kruskal-Wallis-Vortest mit anschließender Nachtestung über den Mann-Whitney-U-Tests bei fehlender Normalverteilung. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$;

Abbildung C: Deskriptive Darstellung der angewandten Test; Darstellung des Mittelwerts, Minimums und Maximums; Erreichte der Kruskal-Wallis-Test ein Signifikanzniveau von 5% wurde eine Nachtestung vorgenommen. Da jeweils keine Normalverteilung vorlag, kam der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz.

A		Ko	MC	CU	Expressionsverhalten von miRNAs Erkrankung: Ko vs CU vs MC Material: nicht entzündetes Colon Herkunft: Kollektiv
	Probenanzahl		23	12	
Geschlecht					
	weiblich	11	4	2	
	männlich	12	8	9	
Alter					
	Median	61	47	51	
	Spannbreite	18 - 76	23 - 65	20 - 61	
Therapie					
	keine	23	0	0	
	Mesalamine	0	1	1	
	Antibiotika	0	0	1	
	Steroide	0	0	1	
	Immunmodulatoren	0	7	4	
	Biologics	0	4	1	
	Therapieresistenz	0	0	1	
	ohne Informationen	0	0	2	
Erkrankungsjahre					
	Median		16	20	
	Spannbreite		0 - 30	1 - 29	



C	Gruppe	Untersuchung	p-Werte der miRNAs											
			let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
Kontrolle	Minimum		0,011	0,107	0,130	0,120	0,124	0,116	0,106	0,009	0,055	0,048	0,139	0,015
	Maximum		50,111	24,160	6,641	16,109	28,113	33,999	12,502	10,281	41,772	29,210	21,567	82,503
	Mittelwert		5,766	2,615	1,811	2,278	2,796	3,130	1,358	1,821	4,335	4,068	2,862	10,873
Morbus Crohn	Minimum		0,007	0,170	0,116	0,226	0,170	0,284	0,059	0,021	0,122	0,000	0,238	0,073
	Maximum		9,266	4,068	1,501	15,751	4,450	5,852	1,045	2,569	3,942	2,648	5,368	2,125
	Mittelwert		1,151	0,939	0,496	3,702	1,402	1,426	0,358	0,630	1,069	0,657	1,219	0,683
Colitis Ulcerosa	Minimum		0,002	0,065	0,012	0,063	0,058	0,064	0,051	0,003	0,013	0,063	0,092	0,054
	Maximum		12,128	64,592	0,774	15,456	9,161	4,733	1,996	4,948	25,731	13,826	54,282	73,170
	Mittelwert		2,459	6,508	0,405	3,520	2,124	1,612	0,473	1,106	3,800	1,417	5,738	8,406
nicht entzündet	Kruskal-Wallis		0,134	0,085	0,006	0,343	0,639	0,942	0,095	0,499	0,707	0,009	0,392	0,608
	KO vs CU			0,091	0,009				0,143			0,003		
	MC vs CU			0,976	0,740				0,786			0,169		

4.4.5 Vergleich der miRNA-Expression bei Colitis ulcerosa-Patienten mit entzündeten Kolongewebe und dem nicht-entzündeten Kolongewebe der Kontrollgruppe

Biopsien von entzündetem Gewebe wurden bei 23 Patienten mit Colitis ulcerosa analysiert. Darunter befanden sich 7 Frauen und 16 Männer. Die Altersverteilung lag zwischen 20 und 75 Jahren mit einem Median bei 50 Jahren. Die Erkrankungsdauer lag zwischen einer Erstdiagnose (0 Jahre) und 29 Jahren (Median 20 Jahre). Ein Patient erhielt auf Grund der Erstdiagnose zum Untersuchungszeitpunkt noch keine Therapie. Ein weiterer erhielt Mesalamine, ein anderer Antibiotika. Zwei Patienten bekamen bedingt durch einen akuten Schub Steroide. Immunmodulatoren (n = 11) sowie Biologics (n = 2) stellten die überwiegenden Therapien dar. Bei drei Patienten lagen keine Angaben vor, zwei Patienten waren bereits Non-Responder (vgl. *Abbildung 22 A*).

Die Deskription für die entzündlichen Dickdarmbiopsien erfolgt in *Abbildung 22 C*. Dargestellt werden neben der untersuchten Probenanzahl der Mittelwert, das Minimum und Maximum für die einzelnen analysierten miRNAs pro Gruppe. In der Kontrollgruppe konnten bis auf die let-7d (n = 20) sowie die miR-141 (n = 22) alle 23 Biopsien pro miRNA analysiert werden. Auch bei den entzündlichen Biopsien aus dem Dickdarmgewebe von Morbus Crohn (n = 13), sowie den Colitis ulcerosa Patienten (n = 23) konnten alle Biopsien berücksichtigt werden. Von den ursprünglich sechs Proben der Patienten mit einer infektiösen Kolitis blieben bei den miRNAs let-7d, miR-141, sowie miR-185 nur jeweils zwei Proben auf Grund technischer Probleme übrig. Aus diesem Grund wurde auch hier wegen der geringen Aussagekraft auf die Berücksichtigung der einzelnen Werte bei der statistischen Auswertung verzichtet (geschwärzte Bereiche). Ausgewertet wurde bei fehlender Normalverteilung mit dem Kruskal-Wallis-Test zu einem angenommenen Signifikanzniveau von 5%. Dabei ergaben sich deutliche Hinweise auf einen signifikanten Unterschied im Expressionsverhalten der einzelnen miRNAs zwischen den einzelnen Gruppen für die let-7d (p = 0,002), die miR-185 (p = 0,054), die miR-374b (p = 0,043) sowie die miR-424 (p = 0,033). Der post-hoc-Test erfolgte an Hand des Mann-Whitney-U Testes für diese miRNAs. Hinweise auf Unterschiede zeigten sich dabei besonders bei der let-7d. Der deutlichste Unterschied lag dabei im Vergleich von Morbus Crohn mit Colitis ulcerosa mit einem p-Wert <0,001. Auch zwischen der Kontrollgruppe und den Colitis ulcerosa Patienten (p = 0,075) bestanden Unterschiede. Bei den miRNAs miR-185 (p = 0,022), miR-374b (p =

0,04) sowie der miR-424 ($p = 0,001$) ergaben sich im Vergleich von Morbus Crohn mit Colitis ulcerosa deutliche Hinweise auf Abweichungen im Expressionsverhalten.

Abbildung 22 A – C: Expressionsverhalten von miRNAs im entzündeten Kolon bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Gruppenvergleich

Abbildung A: Epidemiologische Darstellung zum untersuchten Kollektiv; KO = Kontrollgruppe, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, IC = Infektiöse Kolitis

Abbildung B: Graphische Darstellung des Expressionsverhaltens an Hand von Boxplots; Vortest = Kruskal-Wallis-Test, Nachtest = Mann-Whitney-U-Test. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,005$; *** = $p \leq 0,001$

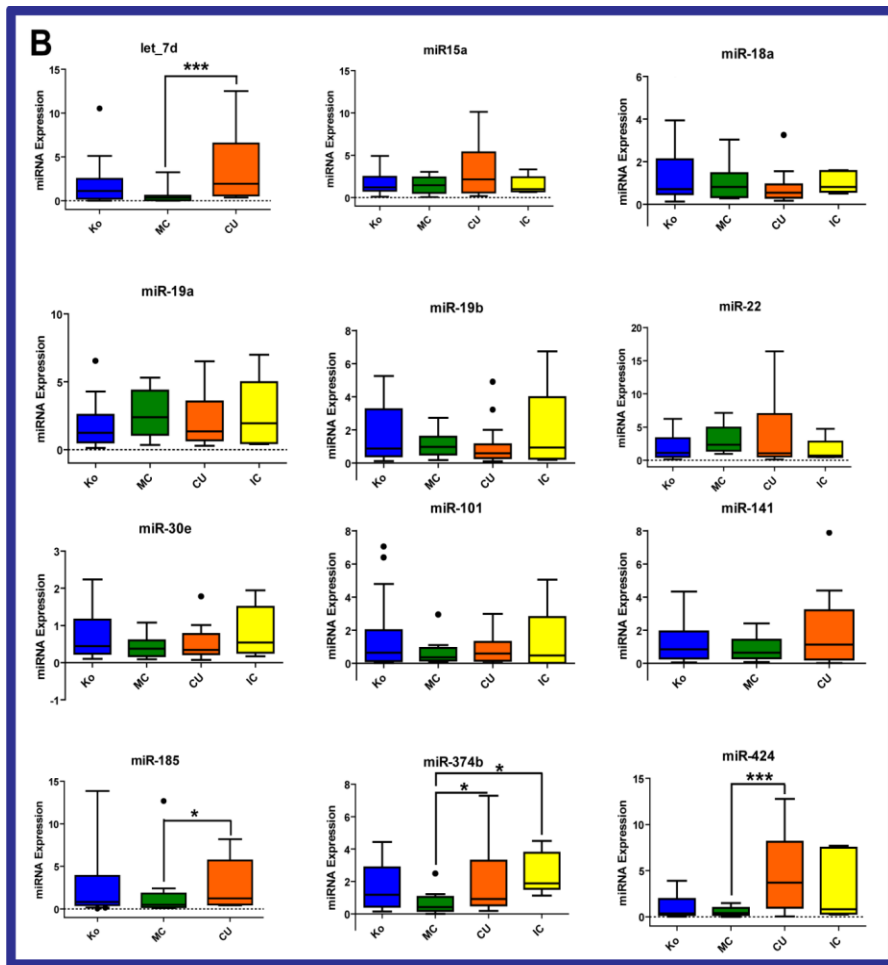
Abbildung C: Deskriptive Darstellung der statistischen Auswertung; geschwärzte Bereiche zeigen an, dass hierin auf Grund der Gruppengröße kein Test durchgeführt werden konnte

A

	KO	MC	CU	IC
Probenanzahl	23	13	23	6
Geschlecht				
weiblich	11	6	7	2
männlich	12	7	16	4
Alter				
Median	61	43	50	66
Spannbreite	18 - 82	17 - 54	20 - 75	31 - 83
Therapie				
keine	23	2	1	5
Mesalamine	0	0	1	0
Antibiotika	0	0	1	1
Steroide	0	0	2	0
Immunmodulatoren	0	6	11	0
Biologics	0	4	2	0
Therapieresistenz	0	0	2	0
ohne Informationen	0	1	3	0
Erkrankungsjahre				
Median		10	20	
Spannbreite		0 - 30	0 - 29	

Expressionsverhalten von miRNAs

Erkrankung: Ko vs CU vs MC vs IC
 Material: entzündetes Kolon
 Herkunft: Kollektiv



C

	let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
Kontrollen (n)	20	23	23	23	23	23	23	23	22	23	23	20
Median	1,11	1,22	0,72	1,24	0,87	1,10	0,45	0,64	0,84	0,82	1,17	0,35
Minimum	0,01	0,11	0,13	0,12	0,12	0,12	0,11	0,01	0,06	0,05	0,14	0,01
Maximum	10,52	24,16	6,64	16,11	28,11	34,00	12,50	10,28	23,67	29,21	21,57	22,41
Morbus Crohn (n)	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Median	0,34	1,46	0,81	2,40	0,98	2,31	0,38	0,35	0,64	0,51	0,41	0,41
Minimum	0,01	0,08	0,28	0,34	0,18	0,95	0,10	0,07	0,09	0,10	0,00	0,00
Maximum	3,25	3,04	3,03	10,39	2,73	7,12	4,47	2,95	12,71	17,95	8,09	1,49
Colitis Ulcerosa (n)	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Median	1,94	2,22	0,55	1,39	0,76	1,13	0,37	0,67	1,13	1,24	0,99	3,81
Minimum	0,37	0,19	0,17	0,28	0,10	0,12	0,08	0,02	0,01	0,44	0,18	0,04
Maximum	12,52	61,51	24,02	40,79	39,63	59,20	66,78	3,37	18,84	24,43	62,49	21,57
Infektiöse Kolitis (n)	2	6	6	6	6	6	6	6	2	2	6	6
Median	1,16	1,25	0,82	2,45	1,07	0,79	0,54	0,51	0,80	1,51	1,88	4,06
Minimum	0,34	0,67	0,51	0,41	0,19	0,42	0,17	0,03	0,43	0,85	1,12	0,25
Maximum	1,97	26,76	1,60	41,11	10,55	24,80	1,95	7,56	1,16	2,18	4,50	9,66
Kruskal-Wallis												
exakte Signifikanz	0,002	0,452	0,293	0,397	0,533	0,214	0,623	0,734	0,814	0,054	0,043	0,033
Post-Hoc-Test												
p-Wert (Ko vs CU)	0,075									0,116	0,784	0,297
p-Wert (MC vs CU)	<0,001									0,022	0,040	0,001
p-Wert (CU vs IC)										0,158	0,733	

4.4.6 Expressionsverhalten der miRNAs bei infektiöser Kolitis im Vergleich zur Kontrollgruppe

Entzündliche Dickdarmareale bei einer infektiösen Kolitis lagen bei sechs untersuchten Patienten vor. Davon waren zwei weiblichen und vier männlichen Geschlechts mit einem Altersmedian bei 66 Jahren (Spannbreite 31 bis 83 Jahre). Einer der Patienten nahm Antibiotika ein, die restlichen fünf Patienten erschienen ohne medikamentöse Vortherapie.

Abbildung 23 C stellt deskriptiv die erzielten Ergebnisse für die Gruppe der infektiösen Kolitis dar. Konnten in der Kontrollgruppe bis auf die let-7d (n = 20) sowie die miR-141 (n = 22) alle 23 Biopsien pro miRNA analysiert werden, mussten von den ursprünglich sechs Proben der Patienten mit einer infektiösen Colitis bei den miRNAs let-7d, miR-141 sowie miR-185 vier Proben auf Grund von Verunreinigungen im RNA-Gewinnungsverfahren ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde auch bei diesen miRNA wegen der geringen Aussagekraft auf die Berücksichtigung der einzelnen Werte bei der statistischen Auswertung verzichtet (geschwärzte Bereiche). Ausgewertet wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test zu einem angenommenen Signifikanzniveau von 5%. Dabei ergaben sich deutliche Hinweise auf einen Unterschied im Expressionsverhalten der einzelnen miRNAs zwischen den einzelnen Gruppen für die miR-185 (p = 0,054), miR-374b (p = 0,043) sowie die miR-424 (p = 0,033). Der post-hoc-Test erfolgte an Hand des Mann-Whitney-U Testes für diese miRNAs. Einen Unterschied zum Signifikanzniveau von 5% zeigte sich dabei ausschließlich bei der miR-374b mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von p = 0,012 zwischen der Morbus Crohn- und der Infektiösen Kolitis-Gruppe. Für die miR-424 konnte zum Signifikanzniveau von 5% kein Unterschied festgestellt werden, jedoch wies auch diese eine Tendenz zur veränderten Expression auf (p = 0,072).

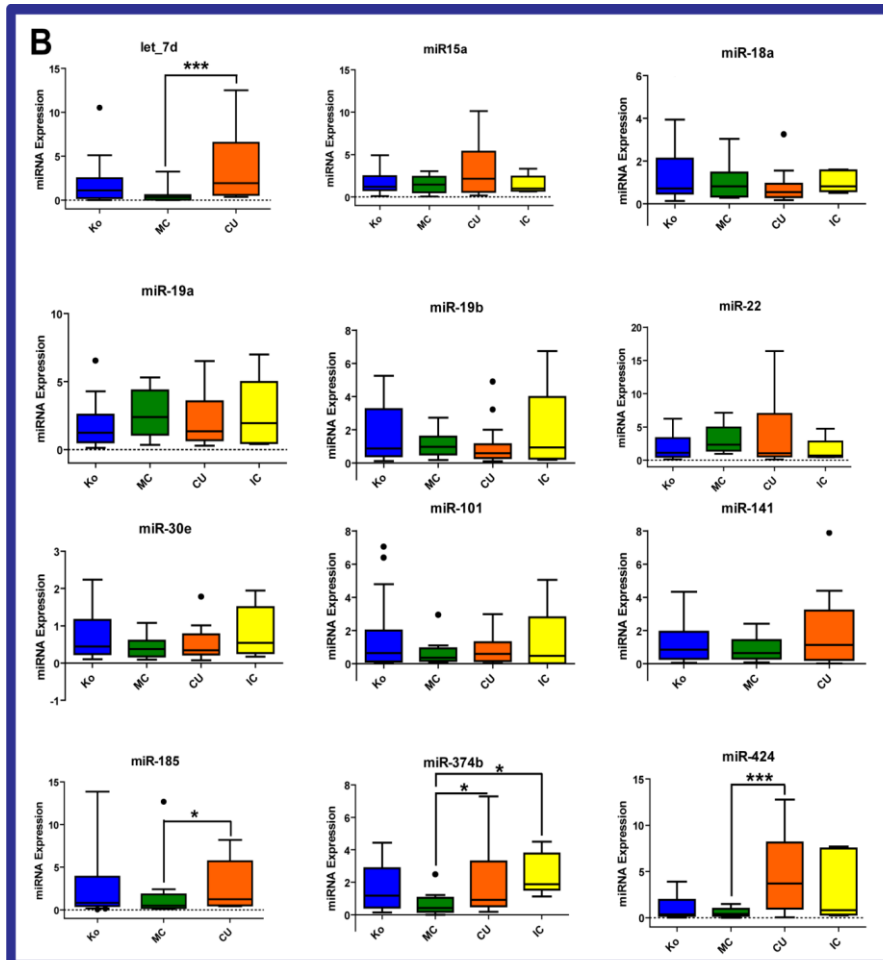
Abbildung 23 A – C: Expressionsverhalten von miRNAs im entzündeten Kolon bei Patienten mit infektiöser Kolitis im Gruppenvergleich

Abbildung A: Epidemiologische Darstellung zum untersuchten Kollektiv; KO = Kontrollgruppe, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, IC = Infektiöse Kolitis;

Abbildung B: Graphische Darstellung des Expressionsverhaltens an Hand von Boxplots; Vortest = Kruskal-Wallis-Test, Nachtest = Mann-Whitney-U-Test; Punkte symbolisieren Ausreißer * = p ≤ 0,05; ** = p ≤ 0,005; *** = p ≤ 0,001

Abbildung C: Deskriptive Darstellung der statistischen Auswertung; geschwärzte Bereiche zeigen an, dass hierin auf Grund der Gruppengröße kein Test durchgeführt werden konnte

A	KO	MC	CU	IC	Expressionsverhalten von miRNAs
	Probenanzahl	23	13	23	
Geschlecht					
weiblich	11	6	7	2	
männlich	12	7	16	4	
Alter					
Median	61	43	50	66	
Spannbreite	18 - 82	17 - 54	20 - 75	31 - 83	
Therapie					
keine	23	2	1	5	
Mesalamine	0	0	1	0	
Antibiotika	0	0	1	1	
Steroide	0	0	2	0	
Immunmodulatoren	0	6	11	0	
Biologics	0	4	2	0	
Therapieresistenz	0	0	2	0	
ohne Informationen	0	1	3	0	
Erkrankungsjahre					
Median		10	20		
Spannbreite		0 - 30	0 - 29		



C	let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
Kontrollen (n)	20	23	23	23	23	23	23	23	22	23	23	20
Median	1,11	1,22	0,72	1,24	0,87	1,10	0,45	0,64	0,84	0,82	1,17	0,35
Minimum	0,01	0,11	0,13	0,12	0,12	0,12	0,11	0,01	0,06	0,05	0,14	0,01
Maximum	10,52	24,16	6,64	16,11	28,11	34,00	12,50	10,28	23,67	29,21	21,57	22,41
Morbus Crohn (n)	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
Median	0,34	1,46	0,81	2,40	0,98	2,31	0,38	0,35	0,64	0,51	0,41	0,41
Minimum	0,01	0,08	0,28	0,34	0,18	0,95	0,10	0,07	0,09	0,10	0,00	0,00
Maximum	3,25	3,04	3,03	10,39	2,73	7,12	4,47	2,95	12,71	17,95	8,09	1,49
Colitis Ulcerosa (n)	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Median	1,94	2,22	0,55	1,39	0,76	1,13	0,37	0,67	1,13	1,24	0,99	3,81
Minimum	0,37	0,19	0,17	0,28	0,10	0,12	0,08	0,02	0,44	0,18	0,18	0,04
Maximum	12,52	61,51	24,02	40,79	39,63	59,20	66,78	3,37	18,84	24,43	62,49	21,57
Infektiöse Kolitis (n)	2	6	6	6	6	6	6	6	2	2	6	6
Median	1,16	1,25	0,82	2,45	1,07	0,79	0,54	0,51	0,80	1,51	1,88	4,06
Minimum	0,34	0,67	0,51	0,41	0,19	0,42	0,17	0,03	0,43	0,85	1,12	0,25
Maximum	1,97	26,76	1,60	41,11	10,55	24,80	1,95	7,56	1,16	2,18	4,50	9,66
Kruskal-Wallis												
exakte Signifikanz	0,002	0,452	0,293	0,397	0,533	0,214	0,623	0,734	0,814	0,054	0,043	0,033
Post-Hoc-Test												
p-Wert (Ko vs IC)											0,142	0,655
p-Wert (MC vs IC)											0,012	0,072
p-Wert (CU vs IC)											0,158	0,733

4.4.7 Expressionsverhalten der miRNAs in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad der Erkrankung

Zur Untersuchung von Veränderungen im miRNA-Expressionsverhalten in Abhängigkeit vom Schweregrad der Entzündung wurden vier Kategorien gebildet. Jedoch konnten nicht alle Proben berücksichtigt werden, da aus Kostengründen nicht zu jeder der miRNAs let-7d, miR-18a, miR-185 und miR-424 das Expressionslevel gemessen wurde. Außerdem wurden ausschließlich Messungen der miRNA-Expression im Dickdarmgewebe berücksichtigt.

Die erste Kategorie bildeten Patienten mit einem entzündungsfreien Darm zum Zeitpunkt der Untersuchung, wobei sowohl die Kontrollgruppe als auch die Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Gruppe mit jeweils neun Patienten gleich groß ausfielen. Die deskriptiven Angaben zur Geschlechts- und Altersverteilung, Therapie und Erkrankungsdauer können der *Abbildung 24 Abschnitt A* entnommen werden.

Die zweite Kategorie bildeten Patienten mit einer sowohl endoskopisch wie auch pathologisch beurteilten leichtgradigen Inflammation. Dabei konnten erneut neben den bereits genannten 9 Vorsorgepatienten 9 weitere Patienten mit Colitis ulcerosa mit einem Altersmedian bei 49 Jahren und einer Erkrankungsdauer zwischen 7 und 29 Jahren erfasst werden. In der Morbus Crohn Gruppe zeigten jedoch nur 3 Patienten eine leichtgradige Entzündung. Der Altersmedian lag hierbei bei 43 Jahren mit einer Erkrankungsdauer zwischen 16 und 30 Jahren. In beiden Erkrankungsgruppen dominierte die Therapie mittels Immunmodulatoren.

Die dritte Kategorie beinhaltete die Patienten mit einer mittelgradigen Entzündung. Auch hierin unterschieden sich die Gruppengrößen mit 7 Colitis ulcerosa und 5 Morbus Crohn im Vergleich zu den 9 gesunden Vorsorgepatienten voneinander.

In der letzten Kategorie befanden sich 8 hochgradig entzündete Biopsien von Morbus Crohn Patienten und 9 von Colitis ulcerosa Patienten. Die Patienten mit Morbus Crohn lagen dabei mit einem Altersmedian von 41,5 Jahren um 9,5 Jahre niedriger als bei Colitis ulcerosa (Altersmedian: 51 Jahre). Auch die Erkrankungsdauer lag mit einem Median von 18 Jahren bei Morbus Crohn niedriger als bei Colitis ulcerosa (Median: 23 Jahre). Die Therapie mit Immunmodulatoren stellte bei beiden Erkrankungen bei gleich vielen Patienten (n = 5) die vorherrschende Therapievariante dar.

Die statistische Auswertung erfolgte an Hand des Kruskal-Wallis-Tests und wurde vom Mann-Whitney-U-Test bei einem Großteil der Untersuchungen weitergeführt.

Eine Ausnahme stellten jedoch die Untersuchung von leichtgradig, mittelgradig und hochgradig entzündetem Kolongewebe bei Morbus Crohn im Vergleich zu leicht-, mittel- und hochgradig entzündetem Kolongewebe bei Colitis ulcerosa dar. Auf Grund von bestehender Normalverteilung bei den miRNAs miR-19b, miR-30e, miR-374b und miR-424 konnte der t-Test für unverbundene Stichproben angewendet werden. Die entsprechenden Signifikanzniveaus wurden mit einem "*" in der *Abbildung 24 C* besonders gekennzeichnet (* = zwischen 0,05 und 0,01; ** = zwischen 0,01 und 0,001; *** = kleiner als 0,001). In der Auswertung zeigte sich, dass die miR-18a sowohl bei Morbus Crohn ($p = 0,007$) als auch bei Colitis ulcerosa ($p = 0,009$) im Rahmen einer Remission eine Veränderung in ihrem Expressionsverhalten im Vergleich zum Kontrollgewebe aufweist. Dabei lag die miRNA-Expression unabhängig vom Entzündungszustand des Gewebes unter der miRNA-Expression der Kontrollgruppe, wobei jedoch kein weiterer statistischer Unterschied nachgewiesen werden konnte. Jedoch veränderte sich im Rahmen des entzündlichen Geschehens die Expression der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 insbesondere bei Colitis ulcerosa. Bei der miRNA let-7d zeigt sich im Rahmen der leichtgradigen und mittelgradigen Entzündung ein zunehmender Anstieg der miRNA-Expression. Befand sich im nicht entzündeten Colitis ulcerosa-Gewebe des Dickdarms eine miRNA-Expression von 0,5, erhöhte sich dieser Expressionslevel auf 2,5 im leichtgradigen und auf 4,7 im mittelgradig entzündeten Gewebe. Im Rahmen der schwergradigen Entzündung blieb jedoch nur die Spannweite der miRNA-Expression mit dem mittelgradigen Entzündungsgrad vergleichbar, wohingegen der Mittelwert wieder auf das Ausgangslevel vom nicht entzündlichen Gewebe abfiel (vgl. hierzu Boxplots der *Abbildung 24 B*).

Abbildung 24 A-C: Entwicklung der miRNA-Expression in Abhängigkeit vom in der Histologie beurteilten Entzündungsgrad; berücksichtigt wurden ausschließlich Proben aus dem Dickdarm

Abschnitt A: Beschreibung des untersuchten Kollektives

Abschnitt B: Darstellung der miRNA-Expressionslevel in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad

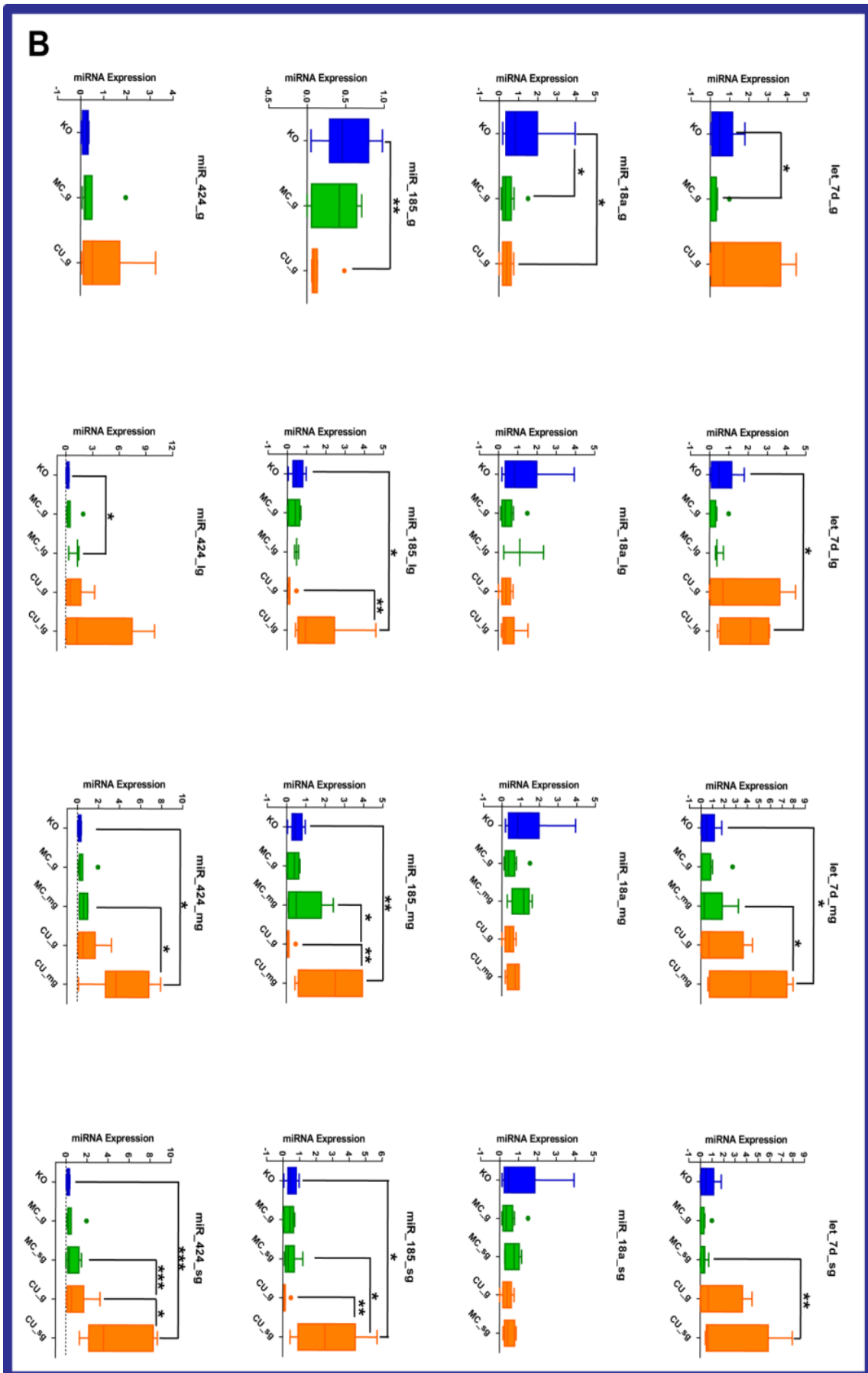
Abschnitt C: Statistische Testergebnisse der vom Entzündungsgrad abhängenden miRNA-Expression; grün = $p < 0,05$ bei Morbus Crohn, rot = $p < 0,05$ bei Colitis ulcerosa, orange = $p < 0,05$ im Vergleich Morbus Crohn versus Colitis ulcerosa

A

	Remission			leichtgradige Entzündung			mittelgradige Entzündung			schwergradige Entzündung		
	KO	MC	CU	KO	MC	CU	KO	MC	CU	KO	MC	CU
Anzahl (n)	9	9	9	9	3	9	9	5	7	9	8	9
Geschlecht												
weiblich	3	3	2	3	1		3	2	4	3	4	4
männlich	6	6	7	6	2	9	6	3	3	6	4	5
Alter												
Median	59	47	48	59	43	49	59	40	52	59	41,5	51
Spannweite	18 - 71	23 - 65	20 - 55	18 - 71	43 - 54	20 - 61	18 - 71	27 - 47	40 - 75	18 - 71	17 - 54	33 - 75
Therapie												
Mesalamine			1			1						
Antibiotika			1									
Steroide			1			1			1			1
Immunmodulatoren		6	4		3	4		3	3		5	5
Biologics		3	1			1		1	1		1	1
Therapieresistenz ohne Therapie			1			1		1	1		2	1
Erkrankungsjahre												
Median		20	13,5		23	27		1	7		18	23
Spannweite		0 - 30	1 - 29		16 - 30	7 - 29		0 - 20	1 - 23		0 - 30	7 - 29

C

Gruppe	Untersuchung	Ort	p-Werte der miRNAs												
			Kolon	let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424
	Kruskal-Wallis			0,003	0,085	0,006	0,189	0,761	0,071	0,606	0,970	0,518	< 0,001	0,249	0,001
in Remission	KO vs MC	X	0,029	0,057	0,007	0,161	0,400	0,878	0,049	0,263	0,488	0,073	0,362	0,632	
	KO vs CU	X	0,823	0,091	0,009	0,954	0,524	0,717	0,143	0,524	0,836	0,003	0,243	0,611	
	MC vs CU	X	0,347	0,976	0,740	0,314	0,974	0,976	0,786	0,821	0,487	0,169	0,608	0,316	
leichtgradige Entzündung	KO vs MC lg	X	1,000	0,209	0,864	0,009	0,145	0,018	0,100	0,864	0,100	0,482	0,145	0,036	
	MC vs MC lg	X	0,295	0,031	0,233	0,233	0,365	0,009	0,136	0,180	0,295	0,633	0,840	0,365	
	KO vs CU lg	X	0,024	0,258	0,546	0,190	1,000	0,190	0,161	0,863	0,489	0,011	0,136	0,094	
	CU vs CU lg	X	0,412	0,201	0,710	0,780	0,604	0,766	0,552	0,905	0,656	0,003	0,503	0,941	
	CU_lg vs MC_lg	X	0,064	0,864	0,600	0,482	0,482	0,373	0,978*	0,864	0,373	0,727	0,918*	1,000	
mittelgradige Entzündung	KO vs MC mg	X	0,518	1,000	0,797	0,190	0,606	0,112	0,606	0,797	0,364	0,699	0,606	0,147	
	MC vs MC mg	X	0,721	0,574	0,064	0,574	0,879	0,279	0,721	0,646	0,879	0,721	0,646	0,721	
	KO vs CU mg	X	0,008	0,055	0,918	0,091	0,536	0,031	0,071	0,918	0,055	0,003	0,031	0,008	
	CU vs CU mg	X	0,151	0,020	0,104	0,813	0,962	0,211	0,246	0,962	0,791	0,003	0,246	0,126	
	MC mg vs CU mg	X	0,018	0,149	0,432	0,755	0,402*	0,639	0,432	0,530	0,639	0,048	0,106	0,01*	
schwergradige Entzündung	KO vs MC sg	X	0,200	1,000	0,673	0,046	0,541	0,027	0,673	0,606	0,321	0,541	0,673	0,321	
	MC vs MC sg	X	0,734	0,343	0,270	0,571	0,970	0,020	0,851	0,851	0,792	0,624	0,157	0,910	
	KO vs Cu sg	X	0,077	0,222	0,730	0,258	0,666	0,063	0,436	0,931	0,222	0,008	0,113	< 0,001	
	CU vs CU sg	X	0,503	0,095	0,456	0,968	0,400	0,552	0,882	0,842	0,603	0,003	0,412	0,056	
	MC sg vs CU sg	X	0,002	0,370	0,541	0,200	0,093	0,321	0,743	0,606	0,673	0,015	0,114	0,001*	



4.5 Zusammenfassende Darstellung der erzielten Ergebnisse

Für **Morbus Crohn** zeigten sich deutliche Hinweise für Unterschiede im Expressionsverhalten von entzündetem zu gesundem **Dickdarmgewebe** bei der miRNA **let-7d**, **miR-15a** sowie **miR-22**. Tendenzen für mögliche Unterschiede wiesen die miR-30e sowie die miR-141 auf.

Bei dem Vergleich von entzündetem **Dünndarm** zu gesundem Dickdarm zeichneten sich andere miRNAs als besonders relevant ab: Nun waren die miRNAs **miR-374b** sowie **miR-424** in ihrem Expressionsverhalten deutlich verändert. Für die miR-185 zeichneten sich Tendenzen für eine Veränderung ab.

In der **Colitis ulcerosa** Gruppe zeichneten sich in der Summe Expressionsveränderungen für die miRNAs **let-7d**, **miR-185** und **miR-424** im Kolongewebe ab.

Die *Abbildung 25* stellt eine Zusammenfassung der errechneten p – Werte dar. Die miRNA let-7d ($p = 0,033$) für Colitis Ulcerosa, sowie die miRNAs miR-30e ($p = 0,042$), miR-141 ($p = 0,05$) sowie die miR-185 ($p = 0,088$) waren dabei nicht nur in der miArray Analyse als mögliche relevante miRNAs aufgefallen, sondern konnten auch in den gezielteren Untersuchungen bestätigt werden. Auffällig war dabei, dass die miRNA let-7d jedoch nicht nur für die Colitis ulcerosa, sondern auch für Morbus Crohn (verbundener, sowie unverbundener Vergleich) eine relevante Bedeutung hat. Außerdem erwiesen sich im Gegensatz zum miArray Ergebnis die miRNAs miR-15a, miR-18a, miR-374b und miR-424 als Hinweise für ein unterschiedliches Expressionsverhalten. Dabei spielen besonders die miRNAs miR-374b und die miR-424 eine besondere Rolle in der Differenzierung zwischen Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, wobei diese beiden miRNAs besonders ausgeprägte Veränderungen im Bereich des terminalen Ileums aufweisen.

Abbildung 25 Zusammenfassende Ergebnisdarstellung der durchgeführten Tests; dargestellt werden die Irrtumswahrscheinlichkeiten in allen analysierten Kategorien für jede der 12 untersuchten miRNAs. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt. Rot eingefärbte Felder symbolisieren relevante miRNA-Expressionsveränderungen bei Patienten mit Colitis ulcerosa (CU). Grün eingefärbte Felder heben die Veränderung in der Kategorie Morbus Crohn hervor (MC). Orange Felder verweisen auf Veränderungen zwischen den Erkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Veränderungen in der Expression bei infektiöser Colitis (IC) werden durch gelbe Felder hervorgehoben. Ergaben sich im Kruskal-Wallis-Test Hinweise auf signifikante Veränderungen in der miRNA-Expression, so wurden diese werteenthaltenden Felder grau eingefärbt. Wurde das Signifikanzniveau von 5% nicht erreicht, jedoch ein Niveau von 10%, so wurden diese Werte ebenfalls fett hervorgehoben und als Tendenz in Richtung einer Veränderung gewertet. Graue Felder ohne Werte markieren die Nichtdurchführbarkeit einer Analyse auf Grund zu geringer Gruppengröße.

Gruppe	Untersuchung	Anzahl (n)	Ort	Kolom	TI	p-Werte der miRNAs													
						let-7d	miR-15a	miR-18a	miR-19a	miR-19b	miR-22	miR-30e	miR-101	miR-141	miR-185	miR-374b	miR-424		
miArray	gesunde KO vs MC	3 vs 3	X			0,554	0,643	0,317	0,024	0,036	0,099	0,042	0,158	0,050	0,088	0,136	0,149		
	entz. CED KO vs CU	3 vs 3	X			0,033	0,280	0,240	0,188	0,131	0,396	0,167	0,129	0,510	0,017	0,274	0,107		
verbundene Stichproben	Entzündet vs nicht entzündet	8	X			0,009	0,018	0,153	0,644	0,002	0,070		0,727	0,070	1,000	0,727	0,896		
	MC (TI vs Kolon CU)	9	X	X		0,483	1,000	0,727	0,673	0,735	1,000	0,008	0,685	0,180	0,062	0,070	0,039		
unverbundene Stichproben	MC vs CU	12	X			0,948	0,450	0,322	1,000	0,774	0,855	0,549	0,343	0,388	0,774	0,459			
	Kruskal-Wallis		X			0,134	0,085	0,006	0,343	0,639	0,942	0,095	0,499	0,707	0,009	0,392	0,608		
nicht entzündet	KO vs MC	23 vs 12	X			0,029	0,057	0,007	0,161	0,400	0,878	0,049	0,263	0,488	0,073	0,362	0,632		
	KO vs CU	23 vs 11	X			0,823	0,091	0,009	0,954	0,524	0,717	0,143	0,524	0,836	0,003	0,243	0,611		
gesunde KO vs Entzündung	MC vs CU	12 vs 11	X			0,347	0,976	0,740	0,314	0,974	0,976	0,786	0,821	0,487	0,169	0,608	0,316		
	Kruskal-Wallis		X			0,002	0,255	0,213	0,274	0,354	0,125	0,526	0,511	0,814	0,054	0,043	0,033		
Entzündung	KO vs MC	23 vs 13	X			0,080	0,745	0,697	0,107	0,558	0,037	0,296	0,281	0,749	0,312	0,065	0,159		
	KO vs CU	23 vs 23	X			0,075	0,191	0,097	0,317	0,199	0,253	0,517	0,652	0,785	0,116	0,784	0,297		
in Remission	MC vs IC	13 vs 23	X			< 0,001	0,149	0,253	0,603	0,328	0,397	0,537	0,415	0,515	0,022	0,040	0,001		
	KO vs IC	23 vs 6	X			0,854	0,896	0,302	0,302	0,773	0,854	0,854	0,813			0,142	0,655		
leichtgradige Entzündung	MC vs IC	13 vs 6	X			0,579	0,966	0,831	0,831	0,898	0,179	0,323	0,765			0,012	0,072		
	KO vs IC	23 vs 6	X			0,813	0,158	0,694	0,445	0,655	0,477	0,477	1,000			0,158	0,733		
mittelgradige Entzündung	KO vs MC	5 vs 11	X			0,177	0,441	0,377	0,145	0,583	0,743	0,090	0,583	0,510	0,005	0,052	0,013		
	Kruskal-Wallis		X			0,134	0,085	0,006	0,343	0,639	0,942	0,095	0,499	0,707	0,009	0,392	0,608		
schwergradige Entzündung	KO vs MC	9 vs 9	X			0,029	0,057	0,007	0,161	0,400	0,878	0,049	0,263	0,488	0,073	0,362	0,632		
	KO vs CU	9 vs 9	X			0,823	0,091	0,009	0,954	0,524	0,717	0,143	0,524	0,836	0,003	0,243	0,611		
gesunde KO vs entzündete CED	MC vs CU	9 vs 9	X			0,347	0,976	0,740	0,314	0,974	0,976	0,786	0,821	0,487	0,169	0,608	0,316		
	Kruskal-Wallis		X			0,037	0,303	0,715	0,061	0,418	0,069	0,120	0,938	0,234	0,055	0,192	0,083		
gesunde KO vs entzündete CED	KO vs MC	9 vs 3	X			1,000	0,209	0,864	0,009	0,145	0,078	0,100	0,864	0,100	0,482	0,145	0,036		
	KO vs CU	9 vs 9	X			0,024	0,258	0,546	0,190	1,000	0,190	0,161	0,863	0,489	0,011	0,136	0,094		
mittelgradige Entzündung	MC vs CU	3 vs 9	X			0,064	0,864	0,600	0,482	0,482	0,373	0,373	0,864	0,373	0,727	1,000	1,000		
	Kruskal-Wallis		X			0,013	0,112	0,803	0,151	0,675	0,059	0,200	0,846	0,147	0,013	0,062	0,012		
schwergradige Entzündung	KO vs MC	9 vs 5	X			0,518	1,000	0,797	0,190	0,606	0,112	0,606	0,797	0,364	0,699	0,606	0,147		
	KO vs CU	9 vs 7	X			0,008	0,055	0,918	0,091	0,536	0,031	0,071	0,918	0,055	0,003	0,037	0,008		
gesunde KO vs entzündete CED	MC vs CU	5 vs 7	X			0,018	0,149	0,432	0,755	0,530	0,639	0,432	0,530	0,639	0,048	0,106	0,048		
	Kruskal-Wallis		X			0,009	0,416	0,806	0,087	0,303	0,040	0,706	0,797	0,362	0,012	0,152	0,000		
gesunde KO vs entzündete CED	KO vs MC	9 vs 8	X			0,200	1,000	0,673	0,046	0,541	0,027	0,673	0,606	0,321	0,541	0,673	0,321		
	KO vs CU	9 vs 9	X			0,077	0,222	0,730	0,258	0,666	0,063	0,436	0,931	0,222	0,008	0,113	< 0,001		
gesunde KO vs entzündete CED	MC vs CU	8 vs 9	X			0,002	0,370	0,541	0,200	0,093	0,321	0,743	0,606	0,673	0,015	0,114	< 0,001		
	Kruskal-Wallis		X			0,002	0,370	0,541	0,200	0,093	0,321	0,743	0,606	0,673	0,015	0,114	< 0,001		

4.6 Analyse von Datenbankinhalten zu den in der Expression veränderten miRNAs

Die Datenbanken „miRBase“ des Sanger-Instituts sowie die Inhalte der „GeneOntology“-Datenbank wurden in dieser Arbeit in einer einzigen Datenbank zusammengefasst. Diese ermöglicht die Abfrage von Informationen, an welcher Stelle (Lokalisation), in welcher Funktion und in welchem Pathway sich die von den miRNAs regulierten Proteine befinden. Außerdem wurde die direkte Auszählung und Darstellung der regulierten Proteine auf diese Weise ermöglicht. Die vollständige Darstellung von Lokalisation, Funktion und Pathway erfolgt beispielhaft im folgenden Kapitel, wurde jedoch bei mangelnder Aussagekraft im Verlauf verlassen.

4.6.1 Expressionsveränderungen der let-7d und der miR-22 im Rahmen eines floriden Morbus Crohn mit Befall des Kolons

Bei Morbus Crohn zeigten sich im Rahmen eines Entzündungsschubes im Bereich des Kolons insbesondere Veränderungen der miRNAs let-7d und miR-22. Die gemeinsame Datenbankauswertung lieferte zu diesen miRNAs folgende Daten:

Die durch diese miRNAs regulierten Proteine befanden sich im Bereich von Organellen und deren Umfeld wie dem Cytosol (36%) sowie im Bereich des Plasmamembransystems (32%). Besonders viele dieser regulierten Proteine waren im Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum mit dem Golgi-Apparat und dem Cytoskelett zu finden. Bezüglich des Plasmamembransystems ließen sich jedoch keine besonders präferierten Strukturen, wie etwa Transportkanäle, Zelloberflächenstrukturen oder Zellverbindungsstrukturen abgrenzen.

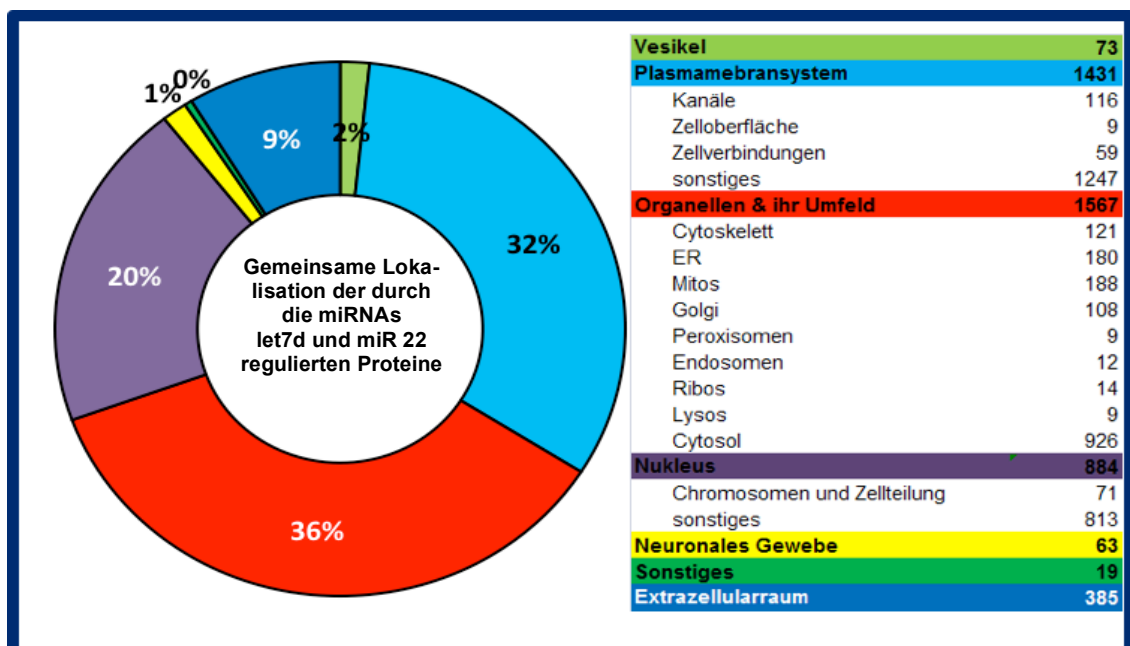


Abbildung 26 Lokalisation der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine

Mit 64% der Gesamtsumme waren die regulierten Proteine primär in Bindungsprozessen involviert, und banden im Rahmen dessen etwa an andere Proteine (n= 1310) und Nukleinsäureverbindungen wie RNA und DNA (n= 690) an. Die zweitgrößte Gruppe mit 19% der Gesamtsumme stellten Proteine dar, welche für Enzymfunktionen insbesondere aus dem Bereich katalytischer Reaktionen (n= 814) benötigt wurden.

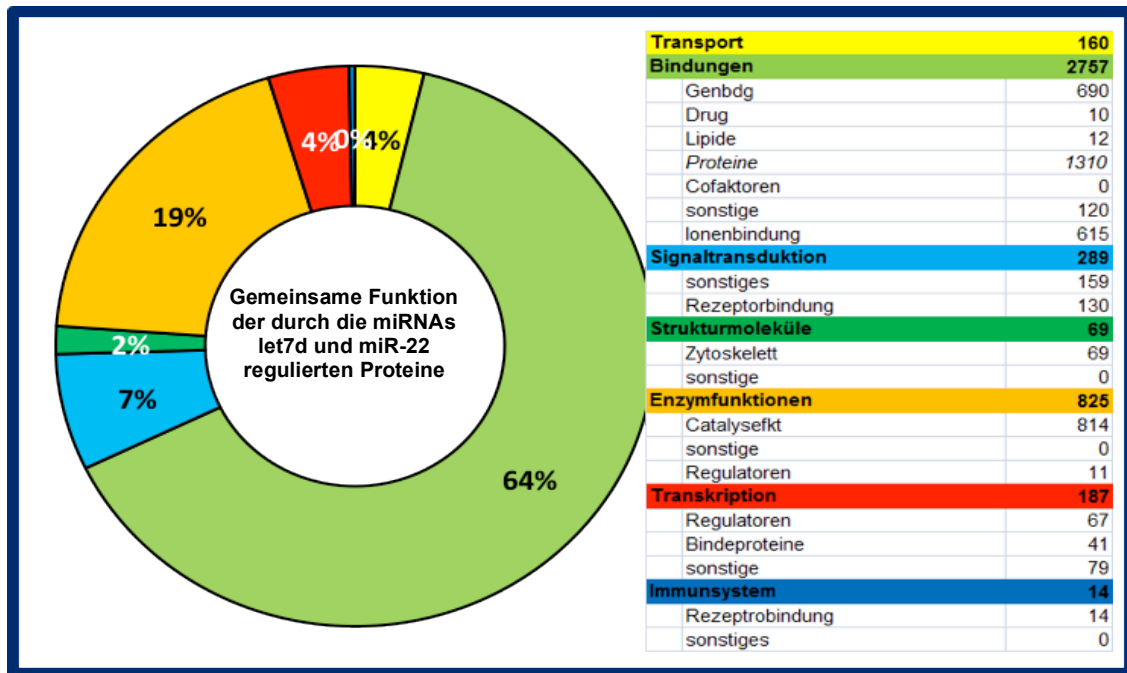


Abbildung 27 Funktion der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine

In der Beurteilung der betroffenen Pathways zeigte sich mit jeweils 19% der Gesamtsumme eine nahezu gleichwertige Inanspruchnahme von metabolischen/synthetischen Prozessen besonders aus dem Bereich der Biosynthese (n= 305), von Regulationspathways mit besonderer Beeinflussung von Transkriptionsprozessen (n= 405) und von Antwortreaktions-Prozessen im Rahmen von Signaltransduktionswegen (n= 299). Transportprozesse stellten mit 11% und Immunsystem-Antworten mit 7% weitere Pathways dar.

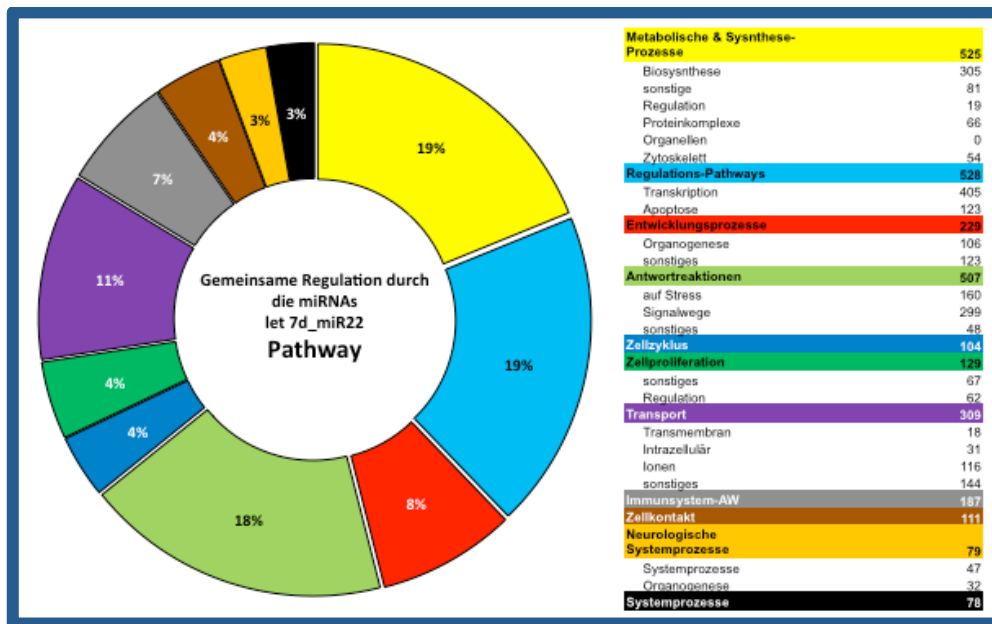


Abbildung 28 Pathways, der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine

Tabelle 26 stellt die 10 häufigsten Proteine dar, welche von den miRNAs let-7d und miR-22 reguliert werden könnten. Für das in 9 Prozesse involvierte Protein C6orf98 wurde aktuell noch keine Untersuchungen unternommen (Einträge zu diesem unter Pubmed NCBI= 0) und es konnte bisher auch noch keine Involvierung im Rahmen von Erkrankungsprozessen festgestellt werden. Ebenfalls fehlen im Zusammenhang zu Morbus Crohn Untersuchungen zu dem Protein ZDHHC16, welches über c-Abl eine pro-Apoptotische Bedeutung besitzt. Spannend, jedoch für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen bisher noch nicht belegt, war das Protein PLEKHG5. Dieses ist in der Aktivierung des NF- κ B und des MAP-Kinase Signalweges involviert und somit für die Einleitung von Apoptose-Reaktionen notwendig. Im Rahmen von Kolon-Karzinomen konnte das Tropomyosin3 (TPM3) nachgewiesen werden, welches sich ebenfalls unter den regulierten Proteinen befindet.

Protein	N	Chromosom	offizielle Bezeichnung	NCBI	Erkrankungen und besondere Funktionen
MRPL23	5	11p15.5	mitochondrial ribosomal protein L23	13	invasives Ovarial-CA und Mamma-CA
TPM3	5	1q21.2	tropomyosin 3	77	Chron. Eosinophile Leukämie, Myasthenie, Schizophrenie, HCC, B-Zell-Lymphome, Myopathie, Colon-CA, papilläres SD-CA, HIV-I,
UROS	5	10q25.2-26.3	uroporphyrinogen III synthase	30	Gunthers-Syndrom, Porphyrie
CIDEC	6	3p25.3	cell death-inducing DFFA-like effector c	22	?
GNG5	6	1p22	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 5	17	AIDS, Magen-CA
PLEKHG5	6	1p36.31	pleckstrin homology domain containing, family G member 5	12	Aktivierung des NF κ B und MAPK-Signalweges, Apoptose, Motoneuron-Erkrankungen
TAF1C	6	16q24	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, C	23	Autismus
GUK1	8	1q32.41	guanylate kinase 1	11	Ziel für Chemotherapeutika, HCC, NCC
ZDHHC16	8	10q24.1	zinc finger, DHHC-type containing 16	8	?
C6orf98	9	6q28.1	chromosome 6 open reading frame 98	0	?

Tabelle 26 Die 10 am häufigsten von den miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine

14 regulierte Proteine nahmen direkten Einfluss auf die Funktion „Cytokine activity“ und haben somit direkten Einfluss auf Immunsystem-Pathways. Immunsystem-Pathways (vgl. *Tabelle 27*) waren etwa die Einleitung von Abwehrmechanismen gegen Viren (via Interferone) und Bakterien (via Interleukine), die Antigen-Prozessierung und Präsentation von Peptiden oder Polysacchariden über MHC II-Moleküle, die Aktivierung des Komplementsystems, die Einleitung von Immunantworten mit Chemotaxis (via Chemotaxine) und letztlich die Entwicklung einer Entzündungsreaktion bis hin zur Einleitung von Apoptose-Vorgängen.

GOID	Pathway	miRNA	N
GO:0051607	defense response to virus	hsa-miR-22	8
GO:0002504	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	hsa-miR-22	9
GO:0006958	complement activation, classical pathway	hsa-miR-22	9
GO:0042742	defense response to bacterium	hsa-let-7d	10
GO:0007166	cell surface receptor linked signal transduction	hsa-miR-22	11
GO:0006952	defense response	hsa-miR-22	13
GO:0006935	chemotaxis	hsa-let-7d	15
GO:0006954	inflammatory response	hsa-miR-22	23
GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	hsa-let-7d	26
GO:0006955	immune response	hsa-miR-22	57

Tabelle 27 Durch die miRNAs let-7d und miR-22 gemeinsam regulierte Pathways aus dem Bereich der Immunsystemantwort; GOID = Identifikationsnummer in der Gene-Ontology Datenbank; N = Anzahl der Treffer; Stand 09/2011

Die Interaktion der regulierten Proteine für den Bereich „Immunsystemprozesse“ wurde durch ClueGO ausgewertet und ist in der *Abbildung 29* dargestellt. Es zeigten sich drei gruppierte sowie drei nicht gruppierte Terme. Die hellgrüne Funktionsgruppe wurde durch den Hauptaspekt „Negative regulation of T-cell receptor signaling pathway“ angeführt und betraf die Regulation des T-Zell-Rezeptors. Das hiermit am meisten assoziierte Gen war *FAS* (TNF receptor superfamily member 6). Die dunkelgrün hervorgehobene Gruppe kam aus dem Funktionskreis der T-Zell Selektion im Thymus und wurde durch den Hauptaspekt „negative thymic T cell selection“ angeführt. Das zentrale Gen dieser Gruppe war *PHPT1* (Phosphohistidine phosphatase 1). Durch das Gen *CALCA* (calcitonin-related polypeptide alpha) waren die Funktionen „positive regulation of macrophage differentiation“ und „negative regulation of osteoclast differentiation“ miteinander assoziiert. Der Lectin-Pathway wurde zweimal dargestellt. Zum einen in Bezug mit dem Gen *MICA* (MHC class I polypeptide-related sequence A) rezeptorgesteuerter Signal-

weg, zum anderen in Bezug mit dem Gen *SERPING1* (serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1) als negativer Regulator der Komplementaktivierung. Außerdem wurde der Term des „nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 signaling pathway“ in Verbindung mit dem Gen *RELA* (v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)) gezeigt.

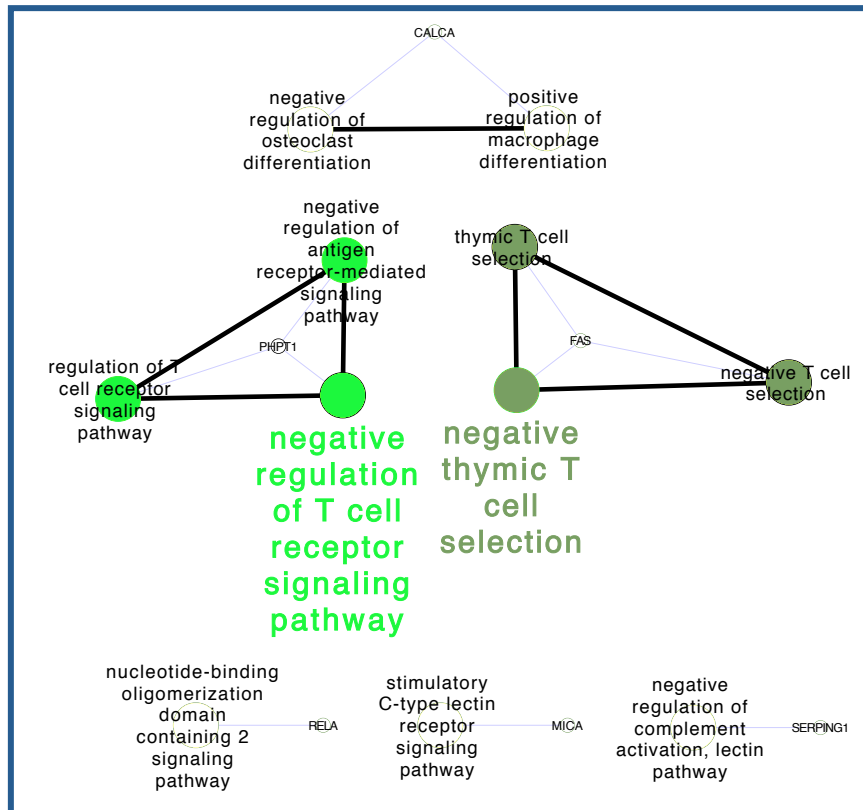


Abbildung 29 Interaktionsnetzwerke der durch die miRNAs let-7d und miR-22 regulierten Proteine aus dem Bereich der Immunsystemprozesse

4.6.2 Expressionsveränderungen der miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 im Rahmen eines floriden Morbus Crohn mit Befall des terminalen Ileums

Die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 wiesen im Rahmen einer Entzündung im terminalen Ileum Veränderungen in ihrer Expression auf. Die regulierten Proteine nahmen dabei Funktionen innerhalb von Organellen sowie im Cytosol (39%), in der Plasmamembran (31%), dem Zellkern (19%) und dem Extrazellulärraum (8%) ein. Am häufigsten waren die Proteine in den Organellen Mitochondrium (n = 334), endoplasmatisches Retikulum (n = 303), Golgi-Apparat (n = 241) und im Cytoskelett (n= 221) lokalisierbar. Die Angaben zu der Lokalisation im Bereich des Plasmamembransystems, des Zellkerns und des Extrazellulärraumes konnten nicht zielführend präzisiert werden.

Die meisten der regulierten Proteine gingen Bindungen (68%) mit anderen Proteinen (n= 2605) ein. Aber auch Nukleinsäuren (n= 1376) sowie Ionen (n= 1154) stellten weitere Zielstrukturen dar. Eine weitere Funktion war mit 19% bei enzymatischen Reaktionen insbesondere in Katalyseprozessen anzutreffen (n= 1404), wobei 68 Proteine Enzymfunktionen regulierten.

Proteine für die Regulation von Transkriptions- (n= 824) und Apoptoseprozessen (n= 229) wurden mit 21% am meisten durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 reguliert. 18% der Proteine waren in metabolischen und in Syntheseprozessen involviert. Im Rahmen von Antwortreaktionen mit Funktionen im Bereich der Signalwege (n= 535) und der Reaktion auf Stressoren (wie etwa Medikamente, Toxine, etc...) (n= 266) waren 16% der regulierten Proteine beteiligt. Transportprozesse innerhalb der Zelle (n= 175) und von Ionen (n=173) stellten mit 10% einen weiteren Anteil der möglicherweise regulierten Pathways dar.

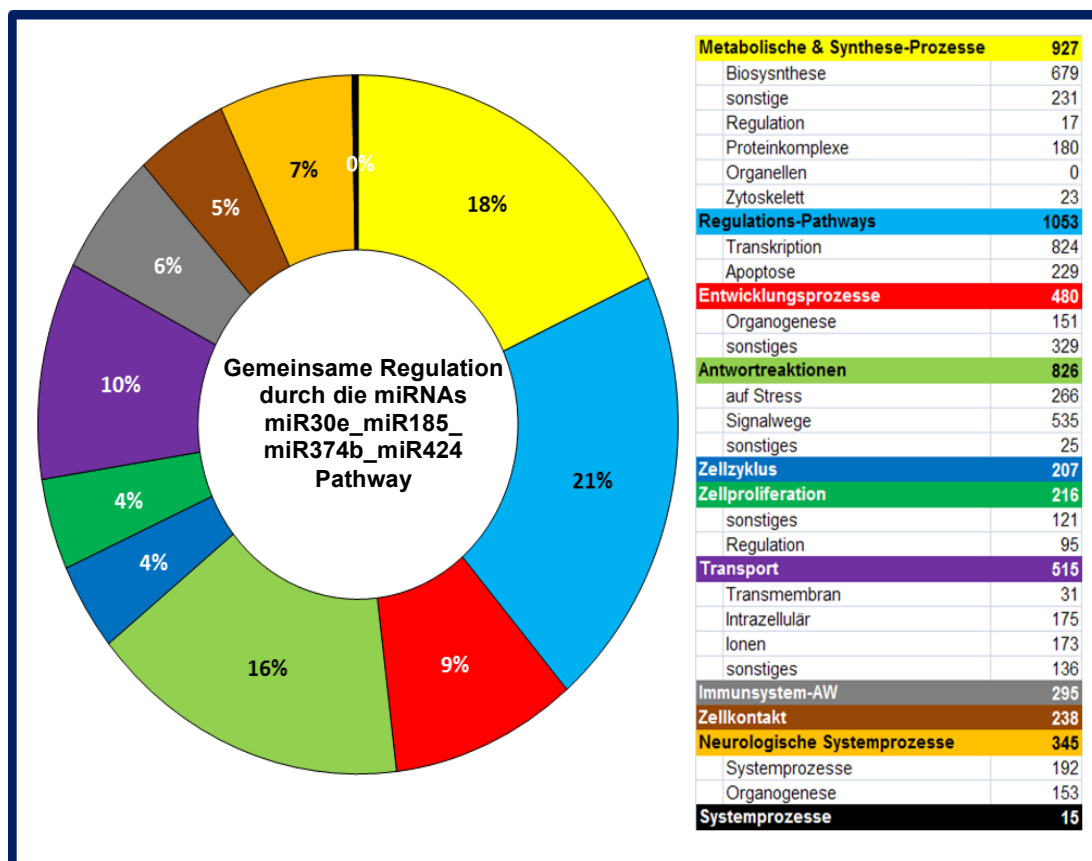


Abbildung 30, Pathway der durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine

Das Protein ZMYM1 wurde über 12 unterschiedliche Mechanismen von den miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 reguliert. Drei wissenschaftliche

Untersuchungen zu diesem Protein ließen sich im August 2011 auf den Seiten von pubmed.org finden, wobei jedoch in keiner dieser Untersuchung Fragen in Bezug auf die Auswirkung auf Krankheitsprozesse gestellt wurden. Im Gegensatz dazu stand jedoch das am zweithäufigsten von diesen miRNAs regulierte Protein. Dieses war über den CD-40 Rezeptor in unmittelbarem Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu bringen. Die jeweiligen Pubmed-Identifikationsnummern in Klammern (siehe *Tabelle 28*) verweisen auf Publikationen, durch die die Bedeutung bei einer Colitis ulcerosa und einem Morbus Crohn dargelegt wurde. Im Zusammenhang von Untersuchungen am Gewebe von Kolon-Carzinomen konnten die Proteine SAT1 (n= 7), Aprataxin (APTX, n= 7) und REV3L (n= 6) als verändert exprimiert herausgearbeitet werden. Diese Proteine wurden ebenfalls von diesen miRNAs reguliert. Im Rahmen des Erkrankungsprozesses von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wurde das Auftreten von Stressgranula beschrieben. Das von den oben beschriebenen miRNAs regulierte Protein TDRD3 (n= 6) stand in einem Zusammenhang mit der Entwicklung von Stressgranula.

Protein	N	Chromosom	offizielle Bezeichnung	NCBI	Erkrankungen
REV3L	6	8q21	REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta	30	Colon-CA, Ösophageale Adeno-CA, Magen-CA, Immunreg, Gliome, Blasen-CA, CLL
TDRD3	6	13q21.2	tudor domain containing 3	13	Stress-Granulas
TGIF2LY	6	Yp11.2	TGFB-induced factor/homeobox 2-like	8	Prostata-CA, Azospermie
APTX	7	9p13.3	aprataxin	54	Colon-Ca, Apraxie, neurodegenerative Erkrankungen
Q13060_HUMAN	7	4q35.2	double homeobox 4 like 9	5	Muskeldystrophie
SAT1	7	Xp22.1	spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1	55	Ovarial-CA, Mamma-CA, Magen-CA, Schizophrenie, Colon-CA, SLE, NSCLC, HIV, Melanom
SPRR2F	9	1q21-q22	small proline-rich protein 2F	7	Psoriasis
ACSL6	10	5q31	acyl-CoA synthetase long-chain family member 6	21	Prostata-Ca, Schizophrenie, vorzeitige Ovariale Dysfunktion, AML
CD40	11	20q12-13.2	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	363	ALL, NHL, SLE, Nieren-CA, UC (16149136) , MC (20634952)
ZMYM1	12	1p34.3	zinc finger, MYM-type 1	3	?

Tabelle 28 Die 10 am häufigsten durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine

Unter Betrachtung, in welchen Pathways die regulierten Proteine möglicherweise beteiligt sind (vgl. *Tabelle 29*), fielen besonders Prozesse der Notch- und des NF- κ B Kaskade auf. Diese können nicht nur Apoptose- und Inflammationsprogramme der Zelle beeinflussen, sondern stehen im unmittelbaren Zusammenhang mit Morbus Crohn.

GOID	Pathway	miRNA	N
GO:0042100	B cell proliferation	hsa-miR-424	15
GO:0007219	Notch signaling pathway	hsa-miR-185	16
GO:0009615	response to virus	hsa-miR-374b	19
GO:0006952	defense response	hsa-miR-374b	20
GO:0006979	response to oxidative stress	hsa-miR-30e	20
GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	hsa-miR-30e	21
GO:0045087	innate immune response	hsa-miR-30e	23
GO:0006935	chemotaxis	hsa-miR-30e	24
GO:0008219	cell death	hsa-miR-424	31
GO:0006917	induction of apoptosis	hsa-miR-185	33
GO:0044419	interspecies interaction between organisms	hsa-miR-30e	48
GO:0006954	inflammatory response	hsa-miR-374b	66
GO:0006955	immune response	hsa-miR-424	80
GO:0006915	apoptosis	hsa-miR-185	83

Tabelle 29 Durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 gemeinsam regulierte Pathways aus dem Bereich Immunsystemantworten und damit zusammenhängende Signalwege

Im Rahmen der Untersuchung der Proteininteraktion für den Bereich Immunsystemprozesse wurden durch die Softwareanalyse drei gruppierte Terme und zwei ungruppierte Funktionsgruppen identifiziert (vgl. *Abbildung 31*). Die Regulation des Klassenswitches von Antikörpern stellt die Kernkomponente der ersten Funktionsgruppe dar, wobei jegliche Proteine dieser Gruppe durch das *CD40*-Gen untereinander assoziiert waren. Weitererhin ließen sich Gruppen mit den Hauptaspekten der positiven Regulation des Signalweges eines T-Zell-Rezeptors (hellgrüne Gruppe) sowie der positiven Regulation des Signalweges der MyD88-abhängigen Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (hellblaue Gruppe) darstellen. Das verknüpfende Gen der hellgrünen Gruppe war *LCK*, welches für lymphocyte-specific protein tyrosine kinase steht. Die hellblaue Gruppe wurde durch das Gen „myelin oligodendrocyte glycoprotein“ (*MOG*) beeinflusst. Ungruppierte Terme stellten der Toll-like-Rezeptor 9 Signalweg mit dem assoziierten Gen *TNIP2*, sowie die positive Regulation der Monozytendifferenzierung über das Gen *CTNIB1* dar.

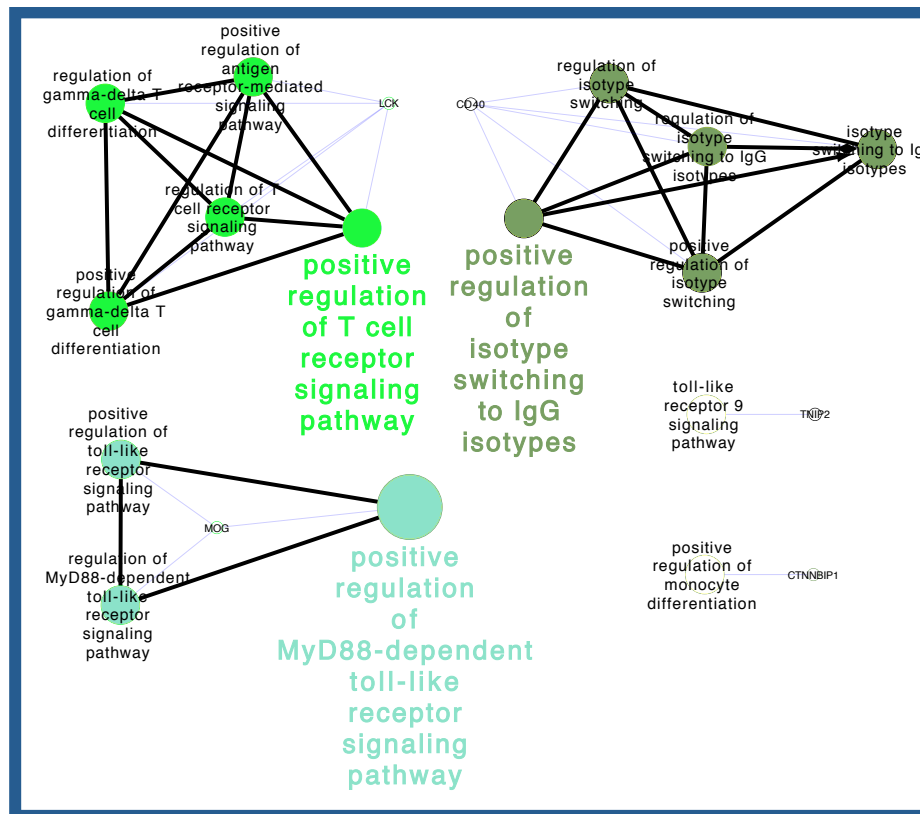


Abbildung 31 Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 regulierten Proteine aus dem Bereich Immunsystemprozesse

4.6.3 Expressionsveränderungen der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 im Rahmen einer floriden Colitis ulcerosa mit Befall des Kolons

Die vier häufigsten Lokalisationen der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine stellen mit 37% die Organellen mit ihrer Umgebung in Form des Zytosols, mit 32% das Plasmamembransystem, mit 19% der Bereich des Zellkerns und mit schließlich 10% der Extrazellularraum dar. In den Mitochondrien (n= 272), dem endoplasmatische Retikulum (n = 242), und dem Golgi-Apparat (n= 200) waren dabei die meisten dieser Proteine innerhalb der Organellen anzutreffen. In Bezug auf das Plasmamembransystem befanden sich die meisten der Proteine auf der Zelloberfläche (n = 566). 99 Proteine waren in den Chromosomen und in Strukturen für die Zellteilung im Zellkern zu finden.

Rund 2/3 der regulierten Proteine nahmen eine Funktion im Rahmen von Bindeprozessen ein (66%). Dabei wurden besonders Bindungen mit Proteinen (n= 1974), aber auch Bindungen mit Nukleinsäuren (n= 1004) sowie mit Ionen (n= 876) eingegangen. 19% der übrigen Proteinfunktionen bezogen sich auf enzymatische Prozesse, wobei auch hier die katalytische Effekte (n= 1074) im Vordergrund standen.

In der Betrachtung der Proteineinbindung in die einzelnen Pathways zeigte sich ein ausgewogenes Bild. Pathways für metabolische und biosynthetische Prozesse wurden von rund 19% der regulierten Proteine beschriftet. 18% der Proteine waren in Regulationspathways eingebunden, wobei erneut der Regelung von Transkriptionsprozessen (n= 522) eine besondere Bedeutung zukam. Rund 191 Prote-

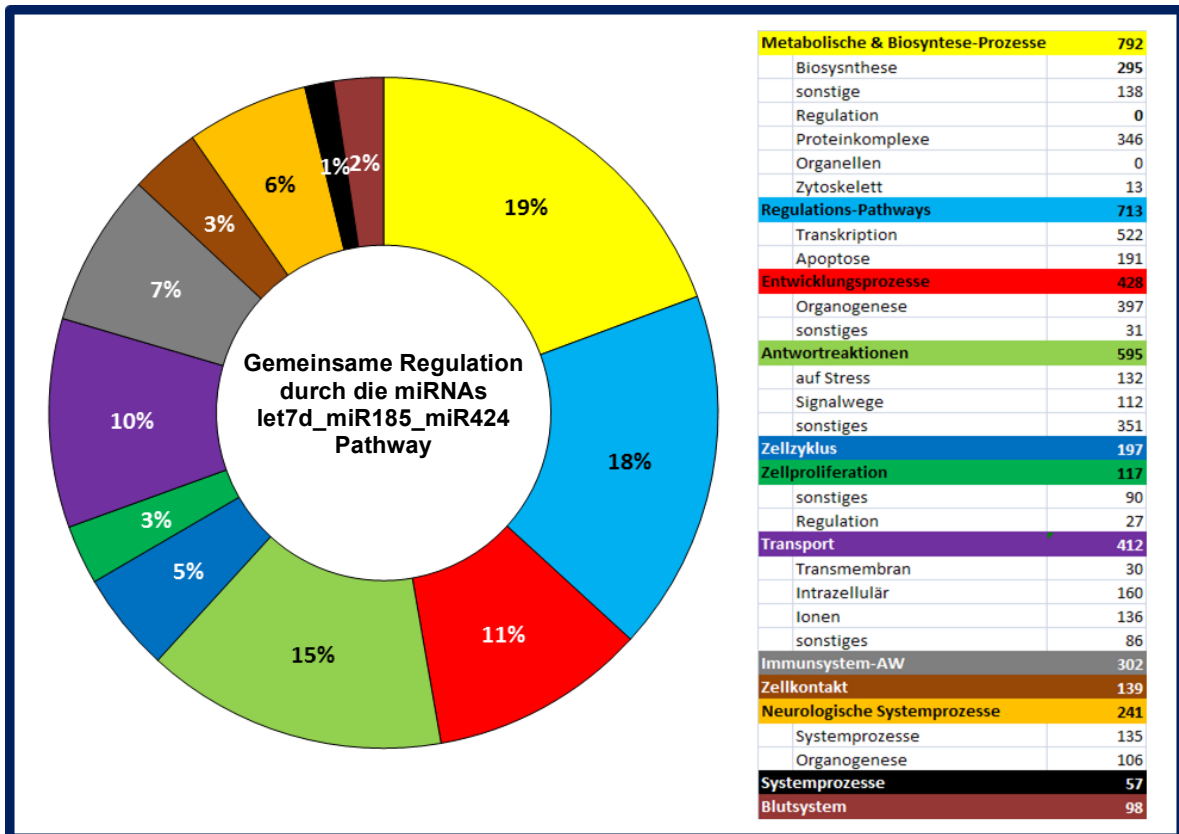


Abbildung 32 Pathway der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine

ine waren in Prozesse der Apoptose involviert. Antwortreaktionen symbolisierten mit einer Beteiligung von 15% der Proteine den dritten Block. Besonders Stressreaktionen (n= 132), aber auch die Beteiligung an Signalwegen etwa im Rahmen von Stimulation an Rezeptoren der Zelle (n= 112) stellten die Beteiligungsfelder dieser Proteine dar. Im Rahmen von Entwicklungsprozessen waren einige Proteine in der Organogenese (n= 397) beteiligt (11%). Auch Transportprozessen (10% der Proteine) besonders im intrazellulären Bereich (n= 160) kamen ein weitere wichtige Beteiligung zu. Besonders ausgeprägt war mit 7% die Beteiligung der Proteine an den Immunreaktionsmechanismen. Auffällig war zudem auch der hohe Anteil an Proteinen in neurologischen Systemprozessen (n= 135, 6% Gesamtanteil).

Im Rahmen der Betrachtung der 10 am häufigsten durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine fiel erneut das CD40-Molekül als Oberflächenrezeptor aus der TNF-Rezeptor Familie mit 11 parallelen Nennungen auf. Erneut waren hinter dem Erkrankungsbild der Colitis ulcerosa sowie des Morbus Crohn Artikel (in Klammern stehen die Pubmed-Identifikationscodes) zu finden, welche den Bezug dieses Proteins mit der Erkrankung an Hand wissenschaftlicher Untersuchungen darstellte. Dem SPRR2F Protein kam im Rahmen der erworbenen Barrierefunktion des Gastrointestinaltraktes eine besondere Rolle zu. An Hand von Untersuchungen von kolorektalen Carzinomen konnten das Proteine Aprataxin (APTX) als auffällig herausgearbeitet werden. Eben dieses Protein wurde ebenfalls durch die herausgearbeiteten miRNAs an 6 unterschiedlichen Stellen beeinflusst. Im Rahmen einer Colitis ulcerosa-Erkrankung kam es ebenfalls zu Veränderungen im Bereich der Konzentration an Sperminoxidase (SMOX). Die miRNAs nahmen auch auf diese in Rahmen von 6 Prozessen Einfluss. Der NF- κ B Signalweg sowie der Signalweg über die MAP-Kinase konnten als relevante Zielwege im Pathogeneseprozess von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen herausgearbeitet werden. Die von den oben genannten miRNAs regulierten Proteine PLEKHG5 und LCK waren ebenfalls in diesen Signalwegen involviert, wobei besonders das Protein LCK zusätzliche Funktionen in der Regulation von peripheren T-Helfer-2-Zellen und deren Entwicklung aufwies. Auch die Signalwege STAT1 und STAT5 wurden beeinflusst.

Protein	N	Chr	offizielle Bezeichnung	NCBI	Erkrankungen und Funktionen
LCK	6	1p34.3	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	357	Gliome, Th2-Funktion peripherer T-Zellen , CLL, ACS, HSV, HIV-1, Asthma, Apoptose , Hypoxie , Miskott-Aldrich-Syndrom, NF-kappa-B-Suppression , T-Zell-Entwicklung und Funktion , STAT1 , SLE, Neuroblastome, Mitochondriale Apoptose , DM 1, Poxvirus, HCC, STAT5
LY9	6	1q23.3	lymphocyte antigen 9	19	HepB, SLE, Lymphoproliferative Erkrankungen
PIB5PA	6	22q12.2	inositol polyphosphate-5-phosphatase J	8	0
PLEKHG5	6	1p36.31	pleckstrin homology domain containing, family G, member 5	12	neuronale Erkrankungen, NF-Kappa-B , MAPK
SMOX	6	20p13	spermine oxidase	25	Angststrg , Mamma-CA , UC (20127992) , Prostata-CA
TGIF2LY	6	Yp11.2	TGFB-induced factor homeobox 2-like, Y-linked	6	Prostata-CA, Azoospermie
APTX	7	9p13.3	aprataxin	54	Mitochondrien-Fkt, Hypalbuminämie, Colorectales-CA , Apraxie, Mantel-Zell-Lymphome, Neurodegeneration, Purkinje-Zell-Degeneration
DUX4L9	7	4q35.2	double homeobox 4 like 9	5	FSHD
SPRR2F	9	1q21-q22	small proline-rich protein 2F	7	Psoniasis, Erworbene Barriere Funktion (11279051)
CD40	11	20q12-q13.2	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	365	ALL, NHL, SLE, Nieren-CA, UC (16149136) , MC (20634952)

Tabelle 30 Die 10 am häufigsten durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine

In der *Abbildung 33* wird das Interaktionsnetzwerk für die Proteine dargestellt, welche durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 reguliert werden.

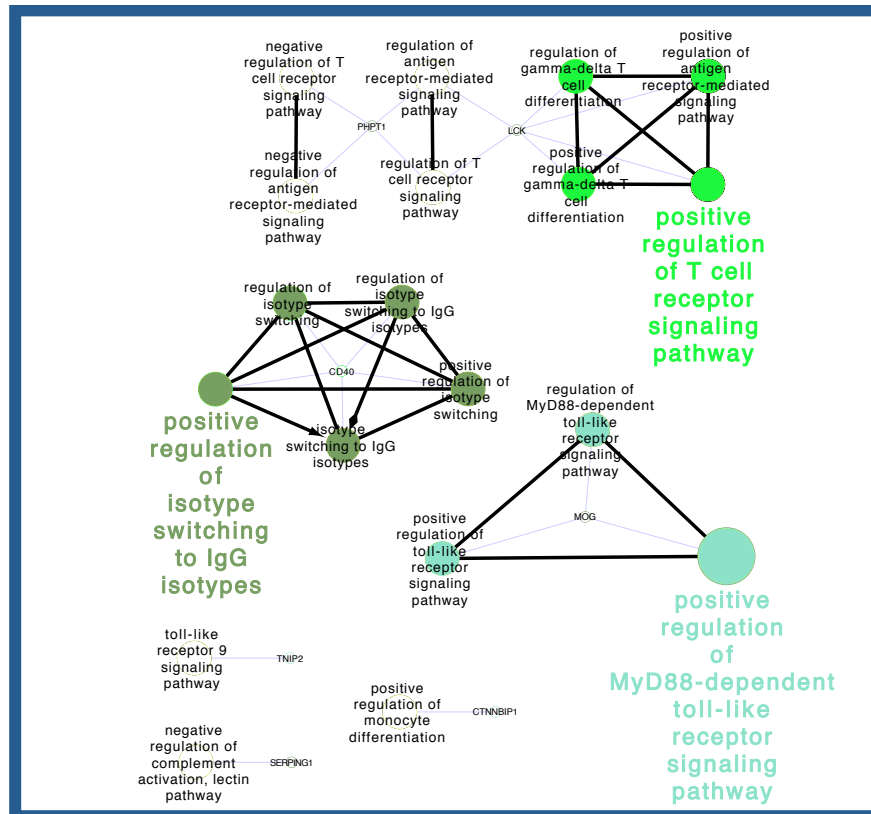


Abbildung 33 Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine

Dabei ergaben sich drei farblich hervorgehobene Interaktionsgruppen. Diese bestanden aus der positiven Regulation des Isotypenswitches von Antikörpern zur Klasse der IgG-Antikörpern (dunkelgrün, assoziiertes Gen *CD40*), der positiven Regulation des Signalweges ausgehend vom T-Zell-Rezeptor (hellgrün, assoziiertes Gen *LCK*) sowie der positiven Regulation des Signalweges von MyD88-abhängigen Toll-like-Rezeptoren (hellblau, assoziiertes Gen *MOG*). Sieben Interaktionen lagen ungruppiert vor. Dabei handelt es sich im Wesentlichen um die durch den Lecitin-Pathway regulierte negative Komplementaktivierung, der positiven Regulation der Monozytendifferenzierung, weiteren stimulierenden wie repressiv wirkenden Beeinflussungen der Regulationen des T-Zell-Rezeptor- und des Antigen induzierten Signalweges, sowie der Aktivierung von Toll-like Rezeptoren der Klasse 9.

4.6.4 Expressionsveränderungen der miRNAs miR-18a und miR-185 im Rahmen der Remission

Die miRNAs miR-18a sowie auch die miR-185 wiesen zeitgleich Veränderungen im Rahmen der Remission auf, so dass auch diese beiden miRNAs gemeinsam auf ihre möglichen Auswirkung auf Proteine an Hand der Datenbankaussagen ausgewertet wurden. Die von diesen regulierten Proteine ließen sich mit 38% der

Gesamtsumme in Organellen und dem Cytosol lokalisieren. Als bevorzugte Organelle ließ sich das endoplasmatische Retikulum mit 150 Treffern identifizieren, wobei auf dieses der Golgi-Apparat (n= 141), das Cytoskelett (n= 136) und das Mitochondrium (n= 123) folgten. Im Plasmamembransystem waren weitere 33% der Proteine anzutreffen, wobei sie besonders im Rahmen von Kanalstrukturen (n= 435) anzutreffen waren. Der Zellkern umfasst den dritten Ortungsblock mit rund 18% der Proteine.

Die Funktion der meisten Proteine lag erneut im Bereich von Bindungsaufgaben (67%), wobei neben anderen Proteinen (n= 1288) auch Nukleinsäuren (n= 578) sowie Ionen (n= 514) gebunden wurden. 18% aller Proteine waren Enzymfunktionen insbesondere im Rahmen von Katalyseprozessen (n= 632) zuzuordnen. Signaltransduktionen stellten mit einer Beteiligung von rund 5% den dritten Block der Proteinfunktionen dar, wobei besonders Funktionen im Bereich der Rezeptorbindung mit 138 Nennungen zum Tragen kamen. Rezeptorbindungen im Rahmen von Funktionen des Immunsystems (n= 42) fielen mit 1% der Gesamtsumme der regulierten Proteine eher gering aus.

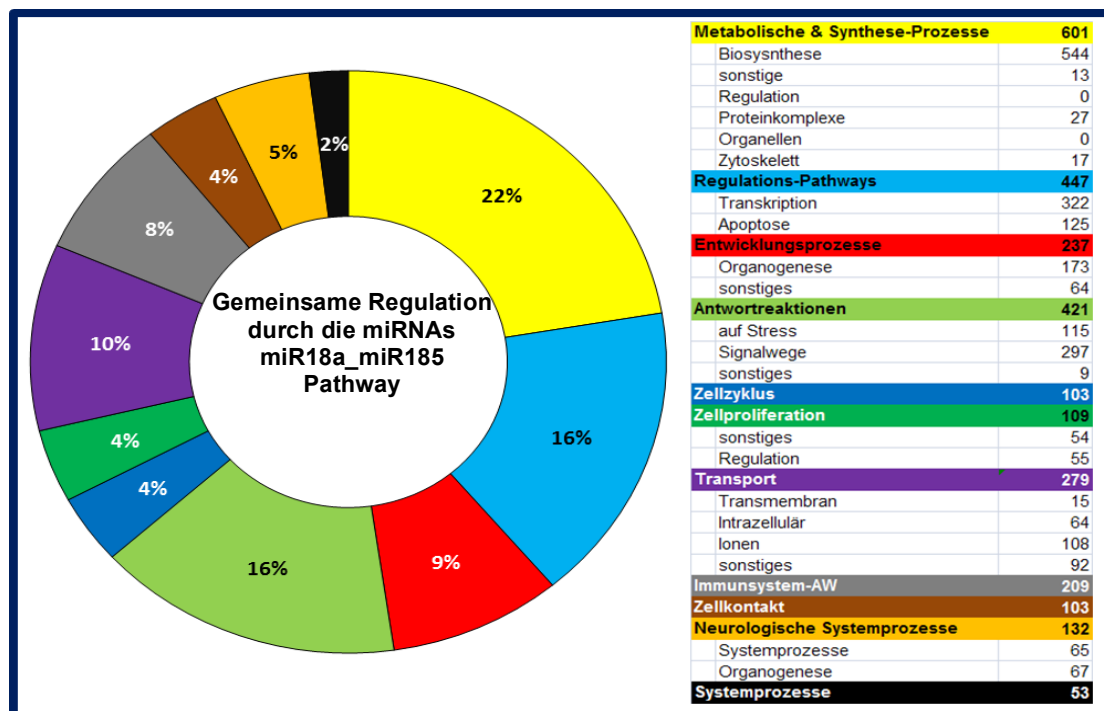


Abbildung 34 Pathway der durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine im Rahmen einer Remission

Mit 22% stellten die metabolischen und synthetischen Prozesse insbesondere in Bezug auf die Biosynthese (n= 544) von Produkten den primären Anteil dar. Regulations- und Antwortreaktions-Pathways wurden von jeweils 16% der regulierten Proteine beeinflusst. 10% der Proteine nahmen Einfluss auf Transportvorgänge

insbesondere von Ionen (n= 108). Auch Immunsystem-Antworten waren mit einem Anteil von 8% von diesen Proteinen betroffen.

Das am meisten von den miRNAs miR-18a und miR-185 beeinflusste Protein war SPRR2F (n= 11), welches jedoch aktuell noch in keinen Zusammenhang mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung gebracht werden konnte. Lediglich das Protein MICA (n= 5) konnte bereits in anderen wissenschaftlichen Untersuchungen zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen als in seiner Konzentration verändert dargelegt werden und wurde durch die miR-18a und miR-185 gemäß den Aussagen der Datenbank beeinflusst. STMN1 (n= 5) konnte im Zusammenhang mit der Metastasierung von Kolon-CAs als verändert aufgezeigt werden und wurde über 5 Mechanismen in seiner Ausprägung durch die oben genannten miRNAs beeinflusst. Ein weiteres spannendes Protein war YIPF1. Dieses Protein wurde an 4 Stellen beeinflusst und hat eine Funktion im Sekretionsvorgang von Vesikeln durch die Plasmamembran.

Protein	N	Chromosom	offizielle Bezeichnung	NCBI	Erkrankungen und Funktionen
YIPF1	4	1p33-p32.1	Yip1 domain family, member 1	10	Sekretory membrane traffic1 (15486293)
ZNF193	4	6p21.3	Zink-finger Protein	9	?
DIO1	5	1p33-32	deiodinase, iodothyronine, type I	37	Leber-Hamangiome, COPD, Nierenzell-CA, McCune-Albright-Syndrom, Mamma-CA, SD-CA
MAP7D1	5	1p34.3	MAP7 domain containing 1	9	Purkinje-Zell-Degeneration
MICA	5	6p21.33	MHC Class I polypeptide-related sequence A	312	Neuroblastome, Osteosarkome, ALL, Lungen-CA, HCV induziertes HCC, Autoimmun Hepatitis, Addison, Colon-CA, CLL, Zöliakie, HepB, CMV, Alzheimer, HSV, Thrombozythopenische Purpura, Mycobakterium avarium Infektionen, Colon-CA, SLE, Ovarial-CA UC (21155878; 21091928; 19016911; 16178876;) MC (17570210)
STMN1	5	1p38.11	stathmin 1	103	Endometriose, Metastasierung Colon-CA, Hepatocelluläres CA, EBV, Magen-CA, Prostata-CA, Medulloblastom, Phäochromozytom, MS, NSCLC, Endokrine-CA, Leukämie, Mamma-CA, Gliome, E. Coli, Alzheimer
NPL	6	1q25	N-acetylneuraminat pyruvate lyase	8	?
Q13060_HUMAN	7	4q35.2	DU:4L9	5	Myoblasten Differenzierung, Muskeldystrophie
LCK	9	1p34.3	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	356	CLL, ACS, HSV, HIV-Typ1, Asthma, Kopf- & Nacken-CA, Mamma-CA, Wiskott-Aldrich-Syndrom, ADAM 15, Hep C, SLE, Neuroblastome, Small Cell Lung Cancer
SPRR2F	11	1q21-22	small proline-rich protein	7	Psoniasis

Tabelle 31 Die 10 am häufigsten durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine

Im Rahmen der Betrachtung des Interaktionsverhaltens der regulierten Proteine konnten zwei Interaktionsgruppen herausgearbeitet werden. Diese ließen sich zum einen in die Gruppe des MyD88-abhängigen Signalweges (hellgrün, assoziiertes Gen *MOG*), zum anderen in die Gruppe des Regulationsprozesses des T-Zell-Rezeptor abhängigen Signalweges (dunkelgrün, *LCK* assoziiert) einordnen. Nicht gruppiert waren die Proteine zur Differenzierung von natürlichen Killerzellen, von Granulozyten und von Makrophagen. Ebenfalls ungruppiert lag der stimulatorische Signalweg des Lectin-Rezeptors vom C-Typ vor.

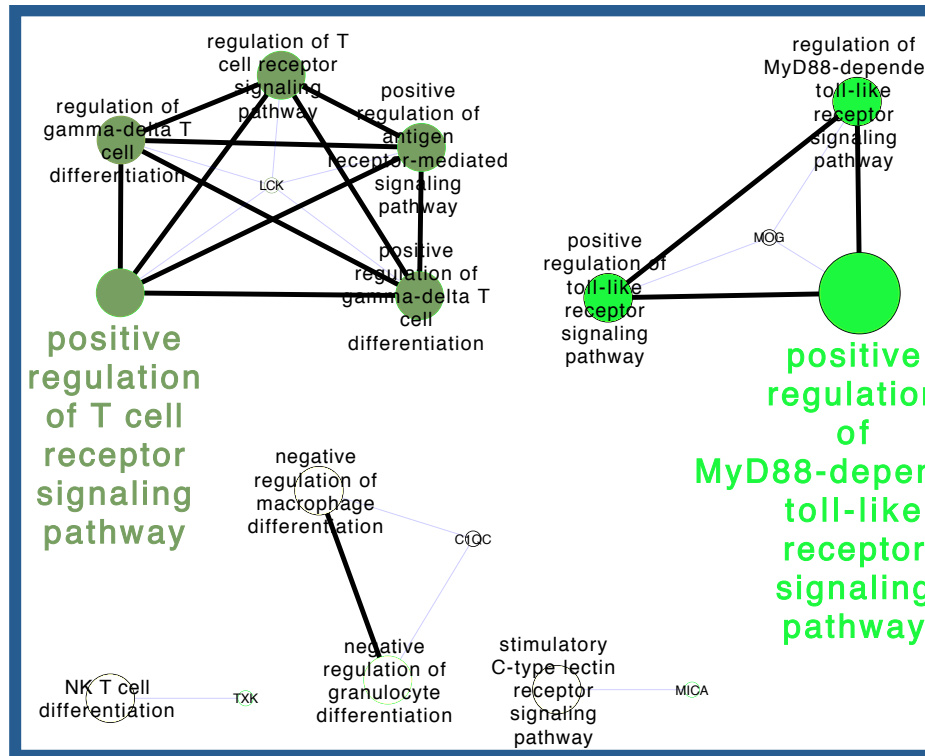


Abbildung 35 Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine aus dem Bereich Immunsystemprozesse

5 Ergebnisdiskussion

5.1 Experimentelles Modell

5.1.1 Maus versus Mensch

In experimentellen Untersuchungen zu pathophysiologischen Vorgängen werden gewöhnlich Mausmodelle bevorzugt. Die Vorteile dieser Modelle liegen in der guten Standardisierbarkeit von Untersuchungsbedingungen, der Kontrollmöglichkeiten von auslösenden Faktoren und der Anpassbarkeit an bestimmte Fragestellungen. Durch Inzucht konnten Tiere mit einer sehr großen Homogenität innerhalb der eigenen Spezies herangezogen werden und Fehler minimiert werden. Außerdem sind 98% der Mausgene zum menschlichen Genom homolog und 80% ortholog (253). Gendefekte konnten an Hand von knockout Mäusen nachgestellt und in ihrer Wirkung untersucht werden (254). Im Rahmen der Untersuchung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind Mausmodellen jedoch Grenzen gesetzt, da Mäuse unter normalen Umständen keine chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa entwickeln. Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen musste daher eine künstliche Manipulation stattfinden. Neben dem Ausschalten von Genen in knockout Mäusen besteht dazu die Möglichkeit, an Hand von Chemikalien wie Dextran-Natrium-Sulfat (DSS) oder an Hand von Bakterien wie *Citrobacter rodentium* oder *Salmonella typhimurium* (255) eine chronische Entzündungsreaktion zu bewirken, welche dem Erscheinungsbild einer CED sehr ähnlich kommt, auch wenn sie keinesfalls gleichwertig ist. Somit ist davon auszugehen, dass Ergebnisse aus Mausmodellen nicht zu 100% auf den Menschen übertragbar sind, sondern nur sehr wertvolle und erklärende Hinweise liefern. Folglich eignen sich Mausmodelle besonders zum nachvollziehen, erklären und bestätigen von Hypothesen, welche im Vorfeld durch Untersuchungen an Menschen gewonnen werden konnten (256).

Auch die Ergebnisse aus der Verwendung von humanem Material sind fehlerbehaftet. Probleme des menschlichen Gewebes bestehen in der fehlenden Homogenität mit einer großen Bandbreite an genetischen Veränderungen, der fehlenden Standardisierbarkeit, dem sehr unterschiedlichen Ernährungs- und Gesundheitsverhalten, der großen Anzahl an Komorbiditäten und einer großen Bandbreite an unterschiedlichen Therapien, welche auf eine Fragestellung Einfluss nehmen können. Mittel, diese Fehler möglichst gering zu halten, sind eine genaue Erfassung von Parametern mit entsprechender statistischer Überprüfung, die Erfassung ei-

nes möglichst großen Kollektives, in welchem sich einzelne Fehler nivellieren und eine möglichst genaue Standardisierung. Außerdem ist auch die Verwendung unterschiedlicher Methoden mit der Untersuchung desselben Parameters sinnvoll. In dieser Arbeit stand die Untersuchung des Expressionsverhaltens von miRNAs im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung im Vordergrund, weshalb die Untersuchung am menschlichen Gewebe unvermeidlich war. Nur hier konnte man entzündetes Gewebe gewinnen, welches seine entzündliche Aktivität im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung aus der natürlichen Genese heraus und ohne externe Manipulation entwickelt hat. Des Weiteren ließen sich auch nur hier die speziell auf das menschliche Gewebe bezogene miRNA-Expression analysieren, um somit humanbezogene Expressionsveränderung aufzeigen zu können. Auch wissenschaftliche Veröffentlichungen zeigen eine Orientierung am humanen Material, um auf diese Weise möglichst präzise Aussagen zu den Vorgängen im Menschen zu treffen (252, 257).

5.1.2 Aktivitätsbeurteilung ohne Goldstandard

Ein entscheidender Baustein in der Ermittlung des miRNA-Expressionsverhaltens ist der Vergleich der miRNA-Expression sowohl im gesunden wie auch im entzündeten Gewebe bei einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung. Außerdem bedarf es einer Klassifizierung der Entzündungsaktivität, da sich während der endoskopischen Untersuchung leichtere, mittelschwere und schwere Entzündungsbilder voneinander abgrenzen lassen. Jedoch besteht noch keine Erfahrung darin, inwiefern der Aktivitätsgrad die miRNA-Expression beeinflusst.

Die entzündliche Aktivität lässt sich über zwei Methoden ermitteln. Zum einen an Hand der endoskopischen Beschreibung der Schleimhaut und der nachfolgenden Zuordnung zu den bereits in der Literaturdiskussion aufgeführten endoskopischen Score-Systemen. Die andere Möglichkeit stellt eine histopathologische Untersuchung an Hand von entnommenen Biopsien dar.

Die Vorteile einer reinen endoskopischen Beurteilung liegen in der geringeren Invasivität und einer schnelleren und deutlich einfacheren Beurteilung. Die Nachteile sind jedoch eine Abhängigkeit der Beurteilung vom jeweiligen Untersucher und dessen Erfahrungsschatz. Somit läuft man Gefahr, einer Untersucherbias zu unterliegen. Außerdem konnte gerade für die Colitis ulcerosa gezeigt werden, dass endoskopisch scheinbar gesundes Gewebe eine entzündliche Aktivität in der Histologie aufweisen kann (173). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass diese

Beschreibung aus dem Jahre 1987 stammt und somit durch den aktuellen Stand der an der Universitätsmedizin Mainz verwendeten High-Definition Technik an Bedeutung verloren haben könnte. Aktuelle Studien zur Klärung dieses Sachverhaltes existieren allerdings derzeit nicht.

Die Vorteile der histologischen Beurteilung liegen in einer genauen Betrachtung der Entzündungssituation innerhalb des untersuchten Gewebematerials. Das Problem hierbei ist jedoch, dass es kein weltweit einheitliches histologisches Klassifikationskonzept zur Beurteilung der Entzündungsaktivität bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen gibt. Somit ist auch hierbei davon auszugehen, dass verschiedene Untersucher besonders an unterschiedlichen Orten zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Beurteilung der Aktivität kommen. Als Folge wurde in dieser Arbeit ein zweigleisiges Konzept angewendet:

Zum einen wurde an Hand der endoskopischen Untersuchung und der vorgefundenen makroskopische Aktivität der Entzündungsreaktion die Diagnose der Erkrankung überprüft. Die eigentliche Aktivitätsbeurteilung erfolgte jedoch auf Grundlage der mikroskopischen Beurteilung, welche ausschließlich durch die Pathologie der Universitätsmedizin Mainz vorgenommen wurde. Da die Beurteilung des mikroskopischen Bildes stets an einem Gewebeprobeanteil der analysierten Biopsie erfolgte, wurde auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass ein gleichwertiger Entzündungsgrad zwischen der durch die Pathologie untersuchten und der auf miRNAs untersuchten Biopsie vorlag. Ein ähnliches Vorgehen ließ sich auch in anderen aktuellen veröffentlichten Publikationen vorfinden (252, 258). Die in dieser Arbeit getroffenen Aussagen sind jedoch präziser, da in den veröffentlichten Studien die analysierte Biopsie aus einem Areal in einem Radius von 10 cm entfernt von der histologischen Biopsie erfolgte und nicht aus unmittelbarer Umgebung (252).

5.1.3 Heterogenität der Biopsielokalisationen

In einer aktuellen Arbeit aus dem Jahr 2010 wurde im menschlichen Gewebe eine unterschiedliche miRNA-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der Biopsie im entsprechenden Darmabschnitt dargestellt (252). Dazu wurden von sechs Patienten jeweils eine Biopsie aus dem terminalen Ileum, dem Coecum, dem Colon transversum, dem Sigmoidium und dem Rektum entnommen, so dass die Fallzahl sehr gering ausfiel.

In dieser Arbeit wurde darauf geachtet, die Lokalisationen der Probenentnahme krankheitsadaptiert an drei Orten, nämlich dem Rektum, dem Colon transversum und dem terminalen Ileum vorzunehmen. Jedoch musste in Ausnahmefällen von dieser Regel auf Grund des fehlenden oder eines zu stark ausgeprägten Entzündungsbildes und unter Berücksichtigung einer besonders hohen Perforationsgefahr für den Patienten, Abstand genommen werden. Stattdessen wurde im Bereich des Übergangs zwischen zwei Darmabschnitten die Biopsie entnommen.

Jegliche nicht entzündlichen Biopsien wurden bevorzugt aus dem Colon transversum als Mittelteil des Darms entnommen. Auf diese Weise war auch mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit zu rechnen, dass sich in einer von dort entnommenen Biopsie eine mikroskopische Colitis ulcerosa finden ließ. Somit ergaben sich in der Kontrollgruppe 20, bei der nicht entzündlichen Colitis ulcerosa 6, beim nicht entzündlichen Morbus Crohn 13 Biopsien. Bei der entzündlichen Colitis ulcerosa wurde besonderer Wert auf Proben aus dem Rektum ($n = 21$) als Quellpunkt der Entzündung gelegt. Da im Rahmen eines Morbus Crohn das terminale Ileum von besonderer Relevanz ist, wurden 15 Biopsien aus diesem Bereich entnommen. Unter der Berücksichtigung der Problematik, dass sich das terminale Ileum in seiner Immunsituation zur Situation im Kolon unterscheidet, wurden zusätzlich noch bevorzugt Biopsien aus entzündlichen Bereichen des Colon transversum ($n = 6$) gesammelt. Das Colon transversum wurde bevorzugt, um dadurch einen besseren Vergleich mit der Kontrollgruppe erzielen zu können, in welcher die meisten gesunden Biopsien aus diesem Bereich genommen wurden.

5.1.4 Ausschluss von Konfoundern

Im Rahmen der Analyse zu möglichen Konfoundern wurde eine Korrelationsanalyse unternommen. Es zeigt sich, dass die Faktoren Geschlecht, Alter, Erkrankungsaktivität und -dauer, Stelle der Biopsieentnahme, Anzahl der Erkrankungsjahre sowie Therapie keinen Einfluss auf die miRNA Expression nehmen. Jedoch muss beachtet werden, dass in einer aktuellen Untersuchung von Zahm et al. gezeigt werden konnte, dass die medikamentöse Therapie Einfluss auf die Expression der miRNAs im Serum hat, auch wenn nicht unbedingt signifikante Unterdrückungen der überexprimierten miRNAs erfolgen müssen (259). Somit besteht also auch in dieser Arbeit die Gefahr, dass miRNAs, welche das Signifikanzniveau knapp nicht erreicht haben, bereits durch eine medikamentöse Therapie in ihrer eigentlich Expression unter Entzündungsbedingungen reduziert sind. Untersu-

chungen, welche den Sachverhalt der medikamentösen Unterdrückung oder gar Förderung der miRNAs-Expression speziell im Schleimhautgewebe untersuchen, existieren zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass die miRNAs miR-15a, miR-19b, miR-22, miR-30e und miR-374b bei gesunden Patienten miteinander in Beziehung stehen.

In der Gruppe der Patienten mit einem Morbus Crohn konnte eine Beziehung zwischen der miR-18a und miR-424 mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,949 und einem Signifikanzniveau von $> 0,001$ festgestellt werden (nicht dargestellt).

Sieben miRNAs in Form der miR-15a, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-22, miR-30e und miR374b standen im Rahmen einer Colitis ulcerosa miteinander in Bezug.

Die hohe Korrelation dieser beschriebenen miRNAs zeigt, dass sich deren Expressionsmuster nur wenig voneinander unterscheidet. Somit ist anzunehmen, dass sie einen Grundlevel der miRNA-Expression im Darm widerspiegeln, gerade die miRNAs, welche jedoch aus diesem Geflecht herausfallen sind in Bezug auf den Pathogeneseprozess der jeweiligen Erkrankung besonders interessant. Auf Grund der fehlenden Beschreibung von durchgeführten Korrelationsanalysen in internationalen Publikationen war ein Literaturvergleich nicht möglich.

5.1.5 RNA-Isolation

Eine Studie vom Dezember 2011 lieferte Hinweise, dass es zu unterschiedlichen Expressionsergebnissen von miRNAs in Abhängigkeit der RNA-Isolationsmethode kommen kann (260). Podolska et al. verglichen dabei zwei etablierte miRNA-Isolationsmethoden:

- Isolation von TotalRNA mit Hilfe von phenol-guanidin-Isozyanaten
- Säulen-basierte Anreicherungsmethode miRVana™ für RNA von einer Länge von < 200 Nukleotiden.

Prinzipiell konnte festgestellt werden, dass höhere Expressionswerte von miRNAs nach der TotalRNA-Isolationsmethode erzielt werden konnten. Dieses galt jedoch nicht für jede miRNA (Bsp: miR-330-3p, miR-628-5p, miR-96, miR-151-3p, miR-142-3p, miR-190). In der Summe ergaben sich somit erhebliche Unterschiede in der Expression einzelner miRNAs im Rahmen von miRNA-Array-Analysen abhängig von der Isolationsmethode, weshalb der Autor eine strenge Beibehaltung der gewählten Analysemethoden empfiehlt und vor einem unkritischen Vergleich von

miRNA-Expressionsprofilen mit der Literatur warnt. Auch diese Empfehlung konnte in dieser Arbeit durch die ausschließliche Anwendung der TotalRNA-Isolationsmethode umgesetzt werden, und wurde in der Diskussion der Ergebnisse berücksichtigt.

5.1.6 Qualitätssicherung und PCR-Verfahren

5.1.6.1 Qualitätssicherungsmaßnahmen

Da miRNAs mit ihrer Länge von 21- 25 nt sehr kleine RNAs darstellen, besteht ein großes Risiko des vorzeitigen Abbaus sowie der Überlagerung der Analyseergebnisse durch Verunreinigung. Somit sind unterschiedliche Qualitätssicherungsmaßnahmen nötig, welche sich aus der strikten Beachtung der Herstellerangaben im Rahmen der Probenvorbereitung (vgl. *Abschnitt 3.2.4.1.*), einer spektrophotometrischen Qualitätskontrolle sowie einer von der Analyse getrennten Reverse-Transkriptase Reaktion zusammensetzen.

Spektrophotometer: Dabei wird die Konzentrationsbestimmung an Hand der Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm vorgenommen. Die Vorteile dieser international sehr weit verbreiteten und täglich angewendeten Methode liegen in der einfachen, kostengünstigen und schnellen Handhabung, um bereits unmittelbar nach Isolation der RNA Aussagen zur Reinheit und der Menge des Isolates zu machen. Diese Methode ist jedoch leider auch sehr fehlerbehaftet (261). Ein Nachteil dieser Methode ist etwa, dass man nur einen sehr kleinen Anteil des Isolates untersuchen kann und es somit bei fehlender adäquater Mischung zu Messfehlern mit Über- bzw. Unterschätzung der tatsächlichen RNA-Konzentration kommen kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die korrekte Messung von chemischen und physikalischen Bedingungen wie Temperatur, Salzkonzentrationen der Puffer und dem pH-Wert abhängig ist (261, 262). Durch die Puffer kommt es erschwerend häufig zu einer Oxygenierung oder zu einer Nitrogenierung der Nukleinsäuren, wodurch sich ebenfalls das Absorptionsspektrum verändern kann und Fehlmessungen entstehen. Beispielhaft wird dieses in einer Publikation von Wilfinger et al. (Jahr 1997) veranschaulicht, wobei sich innerhalb derselben Nukleinsäurenpräparation die errechnete Konzentration um bis zu 25 % (zwischen 0,55 µg/µL – 0,7 µg/µL) bei OD_{260/280}- Verhältnissen von 1,5 – 2,2 voneinander unterschied (263).

Bevor man dieses Verfahren jedoch in Frage stellen kann, lohnt sich der Blick auf die zur Verfügung stehenden Alternativen. Angeboten werden unter anderem Blot-

tingsysteme (für RNAs Northern-Blots), PCR und RealTime-PCR-Analysesysteme, welche jedoch mit einem deutlich höheren Zeit- und Kostenaufwand verbunden sind. Aber auch im Vergleich dieser unterschiedlichen Methoden zur DNA-Quantifizierung konnte gezeigt werden, dass stets Überschätzungen der tatsächlichen DNA-Mengen stattfinden (264) und somit keine Methode optimale Ergebnisse liefern kann.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde der Empfehlung des Herstellers des TotalRNA-Isolationskits Qiagen gefolgt, das spektrophotometrische Analyseverfahren zur Bestimmung der isolierten RNA-Menge zu verwenden. Zusätzlich half dieses Verfahren bei der Abschätzung, der im Rahmen des Isolationsverfahrens gewonnenen RNA-Menge. Um mögliche Missstände in der Mischung auszuschließen, wurde jede Probe nach ausgiebiger Mischung dreimal untersucht. Die RNA-Menge wurde anhand des Querschnitts dieser drei Messungen bestimmt. Da mögliche Messfehler systemischen Fehler darstellten, nahmen sie Einfluss auf alle Proben.

RT-PCR (reverse Transkriptase) stellt ein Verfahren dar, in welchem aus einer beliebigen RNA eine cDNA entsteht, welche anschließend als Schablone (englisch: Template) für eine PCR verwendet wird. Da es in dieser Arbeit jedoch um die Untersuchung ganz spezifischer RNA in Form der miRNA ging, musste eine spezielle reverse Transkriptase zur Herstellung von entsprechender cDNA verwendet werden. Dazu wurde mittels Anfügen eines Poly(A)-Schwanzes eine Poly-A⁺-RNA hergestellt, an welcher im Verlauf ein oligo-dT-Primer binden konnte. Der Vorteil dieser Methode ist, dass komplette cDNAs synthetisiert werden können. Prinzipiell gibt es auch unterschiedliche Typen an reverse Transkriptasen, welche sich in ihrem Arbeitsoptimum und der dadurch bedingten Fähigkeit zur Überwindung von sekundären RNA-Strukturen, in ihrer RNase-Aktivität und somit der synthetisierten cDNA-Transkriptlänge und ihrer Ausbeute voneinander unterscheiden. Sekundäre RNA-Strukturen stellen dabei sogenannte „StemLoops“ sowie die komplizierteren Pseudoknoten dar, welche durch die Interaktion von Nucleotiden über Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen entstehen. Im Bereich der miRNAs bestanden zum Untersuchungszeitpunkt jedoch keine Wahlmöglichkeiten, so dass eine patentierte und nicht näher klassifizierte reverse Transkriptase der Firma Qiagen verwendet wurde. Die reverse Transkription wurde dabei von der PCR getrennt durchgeführt. Hintergrund ist, dass beim

getrennten Vorgehen eine höhere Sensitivität und eine höhere Ausbeute an cDNA erzielt werden kann. Als Erklärung findet man etwa, dass die reverse Transkriptase die Polymerase blockieren kann (265).

5.1.6.2 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Mit dem Ziel eine Quantifizierung von Nukleinsäuren vorzunehmen, wurde die Technik der quantitativen Echtzeit-PCR angewendet. Jedoch ist eine Quantifizierung mittels dieser Technik nicht unproblematisch. Ausgangsgrundlage stellt die Annahme eines Vorgangs mit exponentieller Vermehrung von DNA dar. Jedoch hat sich in genaueren Analysen gezeigt, dass diese Annahme nicht ganz zutreffend ist, da zu Beginn die Menge an DNA-Schablonen noch sehr begrenzt ist und somit die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von Schablonen, Polymerase und Primer niedriger ausfällt. In einer späteren Phase der Amplifikation hingegen kippt das Verhältnis, so dass es zur Produkthemmung kommen kann, weil Produktfragmente miteinander hybridisieren. Zusätzlich nimmt die Zahl der zur Verfügung stehenden Substrate wie Primer oder Nukleotide ab und auch die Enzyme verlieren ihre Funktionstüchtigkeit. Ein relativ exponentieller Anstieg findet sich also nur im mittleren Bereich der Quantifizierung (etwa bis zu einer Produktmenge von 10^{-8} M) (266).

Zusätzlich bedarf es zur Bestimmung einer DNA-Menge eines Orientierungspunktes. Dieser kann mittels eines externen Standards (ein anderes Gen wird zusätzlich amplifiziert, welches in der Template-DNA vorhanden ist) oder eines internen Standards (Zugabe einer definierten Menge eines Standardtemplates, welcher möglichst dem Testtemplate ähnelt) definiert werden (266).

In dieser Arbeit wurde gemäß den Herstellerempfehlungen für die Quantifizierung von miRNAs der externe Standard mittels eines Housekeeping-Gens verwendet. Hierunter muss man folgende mögliche Probleme berücksichtigen: Zum einen kann es zu Unterschieden in der Vermehrungsrate kommen, da zwei verschiedene Fragmente nicht gleich amplifiziert werden müssen. Dieses begründet sich sowohl darauf, dass die Primer mit einer schlechteren Effizienz hybridisieren können, als auch auf der Tatsache, dass sich längere Fragmente bedingt durch Schleifenbildungen und Hybridisierungen schlechter amplifizieren lassen als kürzere. Zum anderen ist auch die Anzahl der verwendeten Amplifikationszyklen kritisch zu sehen, da der exponentielle Bereich nicht verlassen werden sollte (je mehr Schablonenmoleküle, desto weniger Zyklen) (267).

Als sogenanntes Haushaltsgen (Housekeeping gene) wurde das Gen RNU6b verwendet, da man davon ausgeht, dass dieses Gen in allen Ansätzen in einer konstanten Menge exprimiert wird (268). Jedoch zeigen aktuelle Untersuchungen, dass dieser Sachverhalt nicht immer zutrifft, da etwa Tumore eine höhere Expression aufweisen können und daher auch eine gewebeabhängige Expression besteht. Außerdem stellt das Gen RNU6b selbst gar keine miRNA dar (269). Somit ist das letzte Wort bezüglich der Housekeeping-Gene zur Expressionsanalyse von miRNAs noch nicht gesprochen. In aktuellen Veröffentlichungen zur miRNA Expression im Darmgewebe bei CED lassen sich vor allem zwei unterschiedliche Housekeeping genes vorfinden: RNU6b (Synonym U6) (270), sowie RNU48 (271). Eine vergleichende Studie oder eine Empfehlung, welches dieser oder anderer Gene man am besten zur Normalisierung verwendet, existiert jedoch zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. In dieser Arbeit wurde daher den Empfehlungen des Herstellers Qiagen in Übereinstimmung mit dem Vorgehen internationaler Arbeitsgruppen Folge geleistet und die RNU6b als Housekeeping Gene verwendet.

5.1.7 Das Für und Wider von Datenbankanalysen

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, zu den identifizierten miRNAs spezifischere Aussagen über die Funktion, die Lokalisation, die regulierten Proteine und die involvierte Pathways zu sammeln. Als Ziel dieser Zuordnung steht die Absicht, ein kosteneffizientes und effektives Vorgehen für weitere Untersuchungen zu gestalten, da durch die Auswertung von Datenbankinhalten die Herausarbeitung von Thesen erleichtert werden soll. Damit dieses Prinzip jedoch funktioniert, ist sehr viel Geduld und ein umständliches Vorgehen im Vorfeld nötig:

Jede miRNA kann über die miRBase des Senger-Institutes Proteinen zugeordnet werden, welche in der GOID-Datenbank unter einer GOID-Nummer geführt werden. Diese GOID-Nummer symbolisiert den Schlüssel, mit welchem das Tor zu Angaben über die Lokalisation, die Funktion und der Pathway dieser, durch die miRNA regulierten Proteine, geöffnet werden kann. In dieser Arbeit konnte eine zusammenfassende Datenbank erstellt werden, welche mit einer Anfrage das oben beschriebene Vorgehen absolviert und Daten nach der Trefferhäufigkeit sortiert auswirft. Somit ergaben sich pro Anfrage zwischen 200 - 500 teils sehr spezifische Angaben etwa über die Lokalisation eines Proteins (Beispiel: Innere Membran eines Mitochondriums). Zur Thesenbildung war es nun nötig, diese Angaben in Gruppen einzuordnen (Beispiel: Mitochondrium, etc...), was jedoch einen Vorgang

darstellt, bei dem man jede einzelne Angaben persönlich im Internet unter der GOID-Datenbank überprüft. Somit ließ sich letzten Endes herausarbeiten, dass eine miRNA besonders häufig Proteine im Bereich des Mitochondriums reguliert, so dass eine Untersuchung dieser Zielstruktur in Zusammenhang mit dieser miRNA vielversprechend sein dürfte.

Hürden, welche bei diesem Vorgehen genommen werden müssen, sind neben dem hohen Aufwand an Zeit, die Identifikation adäquater Hauptgruppen sowie der Zuordnungsprozess, da teils sehr spezielle Angaben in einen sehr groben Überbegriffsrahmen sortiert werden müssen. Auch die Aktualität der Datenbankanalyse muss stets kritisch betrachtet werden, da täglich unzählige Neuerungen bzw. Änderungen erfolgen, welche nach einem Stichtag nicht mehr berücksichtigt werden können. Somit können nur Ergebnisse entstehen, welche sich auf bereits publizierte Daten beziehen, womit man Gefahr läuft, dass wesentliche Informationen verloren gehen könnten. Allerdings ist diesem Verfahren zu gute zu halten, dass es aktuell kein anderes Verfahren zur spezifischeren Analyse von miRNA Zielgenen gibt. Zu beachten ist auch, dass die Datenbankanalyse nicht mehr an Hand eigener Experimente in ihrer Tauglichkeit situationsbedingt verifiziert werden konnte. Dennoch erfolgt im Rahmen der jeweiligen miRNAs eine Einordnung dieser in die Lokalisation, Funktion und die Pathways der von ihnen regulierten Proteine. Auch die häufigsten regulierten Proteine wurden herausgearbeitet. Ein ähnliches Vorgehen wurde auch in einer aktuellen Publikation von Fasseu M., et al. (257) dargelegt, wobei in dieser die Zuordnung der miRNAs und ihrer Proteine an Hand eines von Kertesz et al. beschriebenen Algorithmus der miRNA-Ziel-Interaktion vorgenommen wurde. Auch in dieser Arbeit war zum Zeitpunkt der Publikation noch keine experimentelle Überprüfung erfolgt.

5.2 Untersuchung der miRNA-Expression

5.2.1 Epidemiologie des Kollektives

Im Untersuchungszeitraum wurden 131 Patienten erfasst. Die Patienten aus der Kontrollgruppe stellten mit einem medianen Alter von 61 Jahren den älteren Anteil der untersuchten Patienten dar, wobei man initial eher mit jungen, gesunden Menschen in dieser Gruppe gerechnet hätte. Das jedoch eher darmgesunde, ältere Patienten anzutreffen sind, lässt sich dadurch erklären, dass in Deutschland erst ab dem 55. Lebensjahr eine Darmkrebsvorsorge mittels Koloskopie für den gesunden Bürger von den Krankenkasse bezahlt (272) wird.

In der untersuchten Gruppe der Morbus Crohn Patienten befand sich der Median der zum Untersuchungszeitpunkt aktiv erkrankten bei 43,5 Jahren. Die sich in einer Remission befindenden Patienten waren hingegen im Median 45 Jahre alt. Somit waren die Patienten der Morbus Crohn-Gruppe im Median um 6,5 Jahre jünger als die an einer Colitis ulcerosa erkrankten Patienten (Median 50 Jahre). Auch das Erstmanifestationsalter der an Morbus Crohn Erkrankten lag im erfassten Kollektiv bei 17 Jahren und war somit um 3 Jahre jünger als der an Colitis ulcerosa Erkrankten (20 Jahre). Somit lässt sich die bereits in der Literaturdiskussion beschriebene Tendenz des im Gegensatz zur Colitis ulcerosa früheren Auftretens im kleineren Kollektiv nachvollziehen (122). Für das erfasste Kollektiv besonders ist das hohe mediane Alter. Dieses resultiert aus der an der Universitätsmedizin Mainz etablierten Spezialambulanz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, welche nicht nur Erstdiagnosen stellt, sondern besonders Patienten mit protrahierten Verläufen begleitet. Auffällig ist auch, dass sich keine Diskrepanz zwischen der Männer- und Frauenverteilung bei den Morbus Crohn Patienten aufdecken lässt. Hätte man auf Grund der epidemiologischen Datenlage eher mit einem besonderen Aufkommen weiblicher Patienten gerechnet (13), ließ sich hier ein ausgewogenes Patientenaufkommen feststellen. Die Erklärung hierfür liegt erneut in der Spezialambulanz, welche durch ihre Patientenselektion eine unkritische Epidemiologie verhindert. Auch der Blick auf die Therapie zeigt, dass es sich um schwerwiegendere Verläufe handelt, welche unter andere den Einsatz von kostspieligen Biologics involvierten.

Patienten mit einer Colitis ulcerosa waren vor allem männlichen Geschlechts, welche aus dem mittleren Alterskollektiv stammten (Median bei 50 Jahren). Diese Befunde decken sich somit mit den Ergebnissen der epidemiologischen Studien (13). Die Patienten, welche erfasst wurden, wiesen jedoch schon sehr lange Krankheitsverläufe mit teilweise bestehender Therapieresistenz als Ausdruck der gleichzeitig bestehenden Krankheitsschwere auf.

In der Summe sind die erhobenen epidemiologischen Daten dennoch nicht repräsentativ, da sie einer Selektionsbias bedingt durch die vorhandene Spezialambulanz, dem angeschlossenen Studienzentrum und der hospitalen Situation unterliegen. Zusätzlich wird auch ein zu kleines Kollektiv repräsentiert.

5.2.2 miRNA Array-Systeme

MiRNA Array-Systeme stellen eine große Chance in der Analyse von miRNA-Expressionsprofilen dar. Jedoch sind sie auch tückenhaft, da systemabhängig miRNAs unterschiedlich gut detektiert und interpretiert werden können (273). Anhand des miRNA-Array Systems "RT² miRNA PCR Array" der Firma SABiosciences konnten 88 miRNAs parallel auf ihre Expression untersucht werden. Jede dieser miRNAs wurde drei mal mit unterschiedlichen Proben analysiert. Die Vorteile waren somit neben einer leichten Handhabung eine breite Erfassung von vielen miRNAs. Die Amplifikationseffizienz wird mit 95,37% und einer Standardabweichung von 6,19% bei n= 468 Arrays beworben. Die Sensitivität liegt laut Herstellerangaben um das 1000fache Höher als Konkurrenzprodukte. Das System soll zuverlässig sogar zwischen den unterschiedlichen miRNAs unterscheiden können, selbst wenn nur ein Nukleotid verändert ist (vgl. miR-99 zu miR-100). Ein zusätzlicher Vorteil des Systems stellt die Detektionsbandbreite dar, bei der sowohl miRNAs niedriger (von 10 pg beginnend) bis hoher Konzentration (bis zu 400 ng) zuverlässig erfasst werden sollen. Weitere Angaben sind den Technischen Spezifikationen auf den Seiten des Herstellers zu entnehmen [http://www.sabiosciences.com/mirna_pcr_product/HTML/MAH-001A.html, "white paper" aufgerufen am 02.07.2011]. Nachteile einer solchen breiten Erfassung sind neben den sehr strengen zu erfüllenden Qualitätskriterien, der hohe Preis und die dennoch bestehende hohe Fehlerquote, wie sie in unterschiedlichen Publikationen beschrieben wurde (274, 275).

Aus statistischer Sicht ist zu beachten, dass im Rahmen der multiplen Testung bei $3 \times 88 = 264$ Tests und dem angenommenen Signifikanzniveau von 5% im Schnitt 13,2 p-Werte unter 0,05 rein zufällig zu erwarten sind. In dieser Arbeit wurden daher die erzielten Ergebnisse der miRNA Array Analyse als reine Anhaltspunkte für weiterführende Auswertungen gewertet.

Eine Zwischenanalyse erfolgte, nachdem zwei Patienten pro Gruppe die vom Array-System erforderten Qualitätskriterien bezüglich der Probengüte erfüllten. Die Hauptanalyse erfolgte unter Berücksichtigung der Proben der Zwischenanalyse nachdem drei Patienten pro Gruppe als tauglich erfasst werden konnten. Dieses Vorgehen war unter statistischen Gesichtspunkten zwar nicht *lege artis*, zum Kennenlernen und zur Einschätzung der Aussagenqualität durch das System jedoch unumgänglich. Außerdem stellte es sich als schwierig heraus, adäquate Proben

zu sammeln, welche jegliche der vom System geforderten Qualitätskriterien erfüllten. Auch sollte die Verwendung des Systems ausschließlich als Orientierungshilfe dienen, so dass in diesem erhobene falsch positive Ergebnisse durch die weiteren Untersuchungen reduziert wurden. Kritisch muss auch gesehen werden, dass der Hersteller keine spezifischen Angaben zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten macht, welche ausschließlich über eine Internetplattform auf Seiten des Herstellers vollzogen werden konnte [http://www.sabiosciences.com/mirna_pcr_product/HTML/MAH-001A.html, "white paper" aufgerufen am 02.07.2011]. Programmier- und Auswertungsfehler konnten somit nicht nachvollzogen oder ausgeschlossen werden.

In der Zwischenanalyse zeigten sich die miRNAs miR-19a, miR-19b, miR-30e, miR-22 und miR-141 für die Erkrankung Morbus Crohn als relevant. In der Hauptanalyse wurden alle diese miRNAs mit Ausnahme der miR-22 bestätigt. Es zeigte sich dabei, dass die miRNAs unter der Erkrankung Morbus Crohn stets hochreguliert waren, was bedeutet, dass sie im Vergleich zur Kontrolle vermehrt exprimiert wurden. Auf Grund der im Vorfeld beschriebenen hohen Fehlerhäufigkeit, wurde die miR-22 in den weiteren Analysen dennoch berücksichtigt.

Für die Colitis ulcerosa wiesen im Rahmen der Zwischenanalyse die miRNAs miR-15a, miR-18a, miR-101, miR-374b, miR-19b und miR-30e deutliche Veränderungen in ihrer Expression auf. In der Hauptanalyse änderte sich das Bild jedoch vollständig und ausschließlich die miRNAs let-7d und miR-185 zeigten eine deutliche Reduktion ihrer Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine derartig komplette Änderung der Ergebnisse kann zum einen durch eine Präzisierung der Ergebnisse erklärt, jedoch auch mit dem hohen Fehlerpotential des Systems in Zusammenhang gebracht werden. Aus diesem Grund wurden jegliche miRNAs der Zwischen- sowie der Hauptanalyse in den spezifischeren weiterführenden Analysen berücksichtigt.

5.2.3 Diskussion der getrennten und verbundenen Analyse

Im Rahmen der Präsentation der Ergebnisse wurde bewusst eine Gliederung gewählt, bei der die miRNA-Expression getrennt nach verbunden und unverbundenen Analysen veranschaulicht wurde.

Verbundene Analysen stellen Untersuchungen der miRNA-Expression innerhalb eines Patienten dar, wobei jeweils entzündetes mit gesundem Dickdarmgewebe eines Patienten verglichen wurde. Das Ziel dieser Analyse basierte auf

der Annahme, dass die miRNA-Expression vom Individuum abhängige, unterschiedliche Basisexpressionslevel aufweisen könnte. Durch den unmittelbaren Vergleich der Expression zwischen aktivem und gesundem Darmgewebe wird somit das Grundniveau berücksichtigt und eine präzisere Aussage zur miRNA-Expressionsveränderung auf Grund der Entzündungsreaktion möglich. Besonders interessant war dieser Ansatz auch deshalb, weil es aktuell (Juli 2012) noch keine vergleichbare Untersuchung dazu gibt. Durch die Veröffentlichung von Wu et al. (252) wurde dieser Ansatz jedoch in seiner Bedeutung reduziert. Der Autor hatte unter anderem im Rahmen seiner Untersuchung bei sechs gesunden Patienten 467 miRNAs auf ihr Expressionsverhalten innerhalb unterschiedlicher Lokalisationen im gesunden Darmes analysiert. Die Lokalisationen stellten dabei das terminale Ileum, das Coecum, das Colon transversum, das Sigmoideum und das Rektum dar. Als normalisierendes Gen wurde *U6B* verwendet. Die Analyse ergab, dass zwar die meisten der untersuchten miRNAs im gesamten Darm ein gleichwertiges Expressionsmuster aufwiesen, jedoch 10 miRNAs (miRNAs miR-31, miR-215, miR-22, miR-26a, miR-19b, miR-422b, miR-23a, miR-126, let-7d und miR-320) lokalisationsabhängige Variationen aufwiesen. Jedoch muss beachtet werden, dass es noch keine bestätigende Studien dazu gibt und auch die Gruppengröße nur sehr klein ausfiel, so dass Konfounder, oder Fehler beispielsweise in Form von kürzlich stattgehabter Infektion oder veränderten Lebensgewohnheit nicht berücksichtigt wurden. Eine Aussage, inwiefern die in der vorliegenden Arbeit untersuchten miRNAs einer lokalisationsabhängigen Variation ihrer Expression unterliegen, kann nicht getroffen werden.

Im Rahmen der unverbundenen Analyse stand das Ziel der allgemeingültigen Herausarbeitung einer miRNA-Expressionsveränderung im Vordergrund. In diesem Untersuchungsschritt sollte also dargestellt werden, dass es in Zusammenhang mit der Erkrankung Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa zu einer allgemeinen und gleichgerichteten Veränderungen der miRNA-Expression im Vergleich zum Kontrollkollektiv kommt. Diese Vorgehensweise des Datengewinnes entspricht somit dem allgemeinen Vorgehen in aktuellen Veröffentlichungen (257, 271). Es wird dadurch auch die Möglichkeit eröffnet, die in dieser Arbeit getroffenen Aussagen – unter Beachtung des angewendeten Isolationsverfahrens (260) – mit der bestehenden Literatur vergleichen zu können.

Im Rahmen der Ergebnisdiskussion wird die in den Ergebnissen begonnene Gliederung verlassen. Es wird somit das Expressionsverhalten der miRNAs nicht gemäß der einzelnen Analysen sortiert diskutiert, sondern unter Beachtung des jeweiligen Krankheitsgeschehens. Dieser Weg wird auf Grund der deutlich angenehmeren Nachvollziehbarkeit für den Leser gewählt.

5.2.4 miRNA-Expression bei Morbus Crohn im Kolon

5.2.4.1 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der verbundenen Analyse

Im Vergleich von gesunden zu entzündetem Dickdarmgewebe innerhalb eines Patienten zeigten sich deutliche Veränderungen der Expression für die miRNAs let-7d und miR-22, sowie eine Veränderung für miR-15a. In allen Fällen war die Expression gesteigert, wobei die deutlichste Expressionssteigerung um das ca. 3-fache für die miR-22 beobachtet werden konnte. Obwohl Wu et al. (252) in der oben genannten Untersuchung aufzeigen konnte, dass sowohl die miR-22 als auch die let-7d lokalisationspezifischen Schwankungen unterliegt, sind die Ergebnisse dieser Arbeit aus folgenden Gründen verwertbar:

Für die let-7d fand Wu et al. eine signifikant veränderte Expressionssteigerung im Bereich des Sigmoideum im Vergleich zu gleichwertigen Expressionsniveaus im Coecum, Colon transversum und Rektum. Somit stammten prinzipiell die meisten der untersuchten Biopsien aus Bereichen, die eine gleichwertige Expression aufwiesen (vgl. *Tabelle 25*). Problematisch sind lediglich die drei Biopsien aus dem Bereich des entzündeten Sigmoideum. Hier stellt sich die Frage, ob es zu einer gesteigerten miRNA Expression der let-7d zusätzlich durch die Entzündungsreaktion, oder ob lediglich die von Haus aus gesteigerte Expression zum Tragen kommt. Da jedoch nur knapp ein Drittel der Werte derartig beeinflusst wurden, jedoch ein klarer Expressionsunterschied aufgezeigt werden konnte, ist mit einer zusätzlichen Expressionssteigerung im Rahmen der Entzündungsreaktion zu rechnen. Eine Präzisierung der Ergebnisse durch einen erneuten Vergleich der let-7d Expression innerhalb eines Patienten mit einem größeren Kollektiv wäre dennoch zu empfehlen. Besonderes Augenmerk sollte darauf gelegt werden, dass dann jedoch unter Aussparung des Sigmoideum nur noch Biopsien aus zwei vorab definierten Kolon-Regionen miteinander verglichen werden.

In der Untersuchung von Wu et al. wies lediglich das terminale Ileum ein signifikant erhöhtes Expressionsniveau der miR-22 auf. Die anderen Dickdarmab-

schnitte (Coecum, Colon transversum, Sigmoideum und Rektum) wiesen hingegen ähnliche Expressionseigenschaften im gesunden Gewebe auf. Die gefundene Expressionssteigerung lässt sich somit mit größerer Sicherheit auf die Entzündungsreaktion zurückführen.

Weitere Hinweise auf Veränderungen im Expressionsverhalten lieferten die miRNAs miR-30e sowie miR-141, welche jedoch mit einem p-Wert von $p = 0,07$ das Signifikanzniveau nicht erreichen konnten. Zur Verifizierung der vermuteten Signifikanz wären somit auch hier weiterführende Untersuchungen der miR-30e sowie der miR-141 an einem größeren Kollektiv nötig.

5.2.4.2 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der unverbundenen Analyse

Die im Rahmen der ausführlicheren Untersuchung erzielten Ergebnisse zu den Patienten der unverbundenen Analyse sind im Vergleich zu den Ergebnissen der verbundenen Analyse inkongruent. Es zeigt sich hierbei, dass weder die let-7d noch die miR-15a eine signifikante Veränderung aufweisen. Unter Beachtung der für die miRNA let-7d beschriebenen lokalgeweblichen Expressionsveränderung (252) erfolgte eine weitere Analyse, wobei jeweils nur entzündliches und nicht-entzündliches Colon transversum miteinander verglichen wurde (vgl. Abschnitt 4.4.2.). Hierbei konnte erneut eine Überexpression der let-7d im Rahmen der Entzündungsreaktion herausgearbeitet und somit bestätigt werden. Zusätzlich konnte in der Untergruppe der Morbus Crohn Patienten mit einer hochgradigen Entzündung eine Veränderung der Expression für die miR-22 nachvollzogen werden. Keine statistisch belegbare Relevanz ergab sich auch im Rahmen dieser Untersuchung für die miR-15a, so dass davon ausgegangen werden muss, dass eine intraindividuelle Expression in der durchgeführten Untersuchung vorlag. Zur Verifizierung wäre jedoch die erneute Untersuchung in einem größeren Kollektiv nötig.

5.2.4.3 Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten miRNA-Expressionsunterschiede im Rahmen eines aktiven Morbus Crohn

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit zwei miRNAs identifiziert werden, welche im Rahmen des Entzündungsprozesses bei bestehendem Morbus Crohn vermehrt gebildet werden. Die erste miRNA stellt die miR-22 dar, welche unter Berücksichtigung des gesamten Dickdarms überexprimiert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die miRNA let-7d besonders im Bereich des entzündeten Colon transversum im Vergleich zum nicht-entzündlichen Colon transversum vermehrt gebildet wird.

5.2.4.4 Vergleich mit der Literatur

Wie der *Tabelle 32 (Stand: 02/2012)* zu entnehmen ist, wurden die hier als überexprimiert erwähnten miRNAs bisher noch nicht publiziert. Zum einen wurden andere Schwerpunkte im Rahmen der Untersuchung gelegt und dadurch die miRNAs daraufhin gezielter analysiert. Eine Fragestellung etwa diente dem Ziel herauszufinden, warum manche Patienten eine stärkere Tendenz zur Ausbildung von Stenosen im Rahmen einer ausgeprägteren Fibrosereaktion aufweisen als andere Patienten mit Morbus Crohn (276). Dazu wurde auf die Erkenntnisse früherer Publikationen zurückgegriffen, welche eine Expressionssteigerung der miR-200-Familie im Rahmen einer renalen Fibrosierung darlegten. Ein anderer Schwerpunkt galt der Untersuchung, wie sich die miRNA-Expression im Rahmen der neoplastischen Transformation von gesundem über dysplastischem zu neoplastischem Gewebe verändert (277). Das Gewebe wurde dazu aus Parafinblöcken der Pathologen entnommen und mittels Array-Verfahren für humane Karzinome (im Handel erhältlich) auf die miRNA-Expression hin untersucht und verglichen.

Material	Probenort		miRNA	Quelle
Human	Kolon	Fibrosiertes Kolon vs nicht fibrosiertes Kolon	miR-200b	(276)
Human	Kolon	Veränderung der miRNA Expression im Rahmen neoplastischer Umwandlung	miR-122, miR-181a, miR-146-5p, let-7e, miR-17, miR-143	(277)
Maus	Kolon	DSS induzierte Entzündung	miR-150	(278)
Human	Kolon	Patienten mit aktivem MC		
Human	Plasma	Untersuchung von Blutproben	miR-16, miR-23a, miR-29a, miR-106a, miR-107, miR-126, miR-191, miR-199a-5p, miR-200c, miR-362-3p, miR-532-3p	(279)
Human	Kolon	Vergleich von gesundem zu entzündetem Sigmaideum	miR-23b, miR-106a, miR-191, miR-19b, miR-629	(252)

Tabelle 32 In der Literatur aufgeführte miRNA Veränderungen im Rahmen eines Morbus Crohn; grün = überexprimierte miRNAs; rot = supprimierte miRNAs; schwarz = alternierendes Expressionsmuster

Lediglich die Publikation von Wu et al. (252) stellt eine vergleichbare Veröffentlichung dar, so dass diese als Vergleichsmaßstab herangezogen wird. Es wurden dabei bei 6 gesunden Patienten jeweils eine Biopsie aus dem Bereich des Terminalen Ileum, des Coecum, des Colon transversum, des Sigmaideum sowie des Rektum entnommen. Zusätzlich erfolgten bei weiteren 7 Patienten jeweils eine gesunde Biopsie aus dem Sigmaideum. Bei Morbus Crohn Patienten erfolgte bei 5 Patienten eine Probenentnahme von entzündetem Gewebe im Bereich des Sigmaideum und bei 6 Patienten im Bereich des Terminalen Ileum. Es wurde die TotalRNA mit Hilfe von Trizol-Reagenz der Firma Invitrogen, als auf Grundlage einer Phenol-Guanidin-Isozyanat basierten Methode, isoliert. Anschließend erfolgte die Aufteilung in eine kleine RNA-Fraktion, bestehend aus RNA-Ketten von einer Län-

ge von <200 Nukleotiden und in eine große RNA-Fraktion mit einer Kettenlänge von >200 Nukleotide. Die kleinen RNA-Fraktionen jeglicher Proben (n = 48) wurden im Anschluss mit Hilfe des NCode Multi-Species miRNA Microarray, V2 Analysesystems der Firma Invitrogen auf ihre miRNA-Expressionsmuster untersucht. Der Vorteil dieses Systems war dabei die zeitgleiche Analyse von 467 humanen miRNAs, wohingegen das in dieser Arbeit verwendete System lediglich nur 88 miRNAs zeitgleich erfassen konnte. Zusätzlich erfolgte die Markierung mit Oyster-550 und Oyster-650 bei 52° für 16 Stunden mit anschließender Auswertung des Fluoreszenzsignales. Die miRNAs wurden als signifikant in ihrer Expression bewertet, wenn ihre Expression im Gruppenvergleich >2, ein P-Wert < 0,05 und ein Fluoreszenzunterschied im Gruppenvergleich von >100 willkürlich gewählten Einheiten (arbitrary units) erreicht wurde. Im Vergleich zu dieser Arbeit waren somit die technischen Herausforderungen in der Analyse von Wu et al. deutlich höher. Jedoch war dieser Aufwand auch nötig, da rein statistisch die Möglichkeit für falsch positive Werte auf Grund mehrfacher Testung höher ausfiel ($((48 \times 467) \times 0,05 = 1120,8$ mögliche falsch positive Werte)). Außerdem wurden alle Proben einmal mit dem miRNA-Array System analysiert, und die in ihrer Expression am stärksten veränderten miRNAs (N = 11; mit verstärkte Expression im Kolon: miR-21, miR-23b, miR-29a, miR-106a, miR-107, miR-126, miR-191 und miR-200c; reduzierte Expression für das Kolon: miR-19b, miR-422b, miR-629) wurden zur Bestätigung einer quantitativen PCR unterzogen. Hierbei konnte eine verstärkte Expression für drei miRNAs (23b, miR-106a und miR-191) sowie eine reduzierte Expression für zwei miRNAs (miR-19b und miR-626) belegt werden. Keine Unterschiede ergaben sich für die restlichen 6 miRNAs (miR-21, miR-29a, miR-107, miR-126 miR-200c, miR-422b). Somit zeigte sich, dass über die Hälfte der angeblich positiven Proben nicht signifikant verändert war. Die Schwächen dieser Arbeit lagen zusammenfassend in der Erfassung eines sehr kleinen Kollektives und der hohen Fehlerquote. Zusätzlich ist es auch nicht möglich nachzuvollziehen, welche miRNAs über das Array-System parallel analysiert wurden, da sich die vom Hersteller angegebene Verlinkung (www.invitrogen.com/ncode; Stand 07/2012) nicht öffnen lässt. Ein direkter Aussagenvergleich ist daher nur noch für die miRNA miR-19b möglich. Wu et al. stellten eine verminderte Expression dieser miRNA fest, welche sich jedoch in dem in dieser Arbeit erfassten Kollektiv nicht zeigte. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass in dieser Arbeit nicht zwischen den einzelnen Darmabschnitten unter-

schieden wurde, da entsprechende Gruppengrößen für eine derartige Untersuchung zu klein ausgefallen wären. Außerdem war zum Analysezeitpunkt auch noch nicht bekannt, dass für die miRNA miR-19b die höchste Expression im Coecum und die niedrigste Expression im Rektum (um das 3,2fache niedriger im Vergleich zum Coecum) bei gesunden Menschen gefunden werden kann, wohingegen das Colon transversum und das Sigmoideum gleichwertige Expressionsprofile aufwiesen (252). Da jedoch nur jeweils eine Biopsie aus dem Coecum und aus dem Rektum in dem hiesigen Kollektiv erfasst wurde, dürften diese beiden Proben von den anderen 15 Biopsien aus Kolonabschnitten gleichwertiger miRNA-Expression ausgeglichen worden sein. Außerdem sind mögliche Analysefehler sowohl in dieser Arbeit sowie in der Arbeit von Wu et al. als weiterer möglicher Erklärungsansatz zu berücksichtigen.

5.2.4.5 Theoretische Abhandlung der gemeinsamen Wirkungsweise der miRNAs let-7d und miR-22 auf den Entzündungsprozess

In der Summe erbrachten die Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion von Proteinen, welche gemäß Datenbankanalysen durch die miRNAs let-7d und miR-22 gemeinsam reguliert werden, keine richtungsweisenden Ergebnisse. Dieses kann damit zusammenhängen, dass die angelegten Zuordnungsraster zu grob gefasst wurden, so dass spezifische Unterschiede in den jeweiligen Gruppen nicht erfasst wurden. Auf der anderen Seite stehen die Ergebnisse aber in Einklang mit den bisherigen Informationen zu den miRNAs, welche besagen, dass sie größtenteils im Nukleus gebildet, an Proteine gebunden, in das Zytoplasma exportiert und dort schließlich primär regulierend aktiv werden (280).

Auch die Pathway-Analyse zeigte keine richtungsweisenden Ergebnisse. Hierbei wurde jedoch verdeutlicht, dass drei Funktionen vor allem von Bedeutung sind: Syntheseprozesse, Regulationspathways für Transkriptions- und Apoptosevorgänge sowie Antwortreaktionen auf Stress und eingehende Signalwege.

Präzisiert werden diese Aussagen durch die Hinweise, dass insbesondere Immunreaktionen durch die positive Regulation des „I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade“ möglicherweise über die Proteine C6orf98, ZDHHC16 und PLEKHG5 ausgelöst werden können. Auch wenn diese Proteine in ihrer Bedeutung in Bezug auf Morbus Crohn noch nicht explizit untersucht wurden, so gibt es dennoch Belege, dass dieser Signalweg in Zusammenhang mit der Entwicklung der Erkrankung Morbus Crohn liegt. Aus dem aktuellen Review von Wei J. et al. (281) geht hervor,

dass NF- κ B ein Transkriptionsfaktor ist, welcher an Antwortreaktionen auf zelluläre Stressreaktionen unterschiedlichster Art beteiligt ist. Störungen im NF- κ B-Signalweg haben Auswirkungen auf die intestinale Barrierefunktion und bewirken übermäßige Freisetzung von T-Effektor-Zellen, welche pathogonisch für den Morbus Crohn sind. Auf der anderen Seite geht aus Studien an Mäusen mit supprimierter NF- κ B-Aktivierung hervor, dass NF- κ B ebenso eine bedeutende protektive Eigenschaft im Rahmen der intestinalen Homöostase spielt (282, 283). Werden zum einen die harmlosen Bakterien in der Darmflora zur Bereitstellung wichtiger, essentieller Vitamine und zur Unterstützung unserer Verdauungsfunktion gebraucht, ist eine schnelle und effektive Immunantwort bei Auftreten schädlicher Darmkeime zur schnellen Eliminierung nötig. Dabei sollte aber die benötigte gute Flora möglichst wenig in Mitleidenschaft gezogen werden. Diese Immunantwort wird über NOD-like- als auch über Toll-like-Rezeptoren eingeleitet, welche im NF- κ B-Signalweg ihre Fortsetzung finden und welche für die adäquate Immunantwort zuständig sind. Die Mechanismen, welche dazu führen, dass NF- κ B sowohl proentzündlich und auf anti-entzündlich wirken, sind bis jetzt jedoch noch nicht detailliert geklärt (284). Gezeigt werden konnte beispielsweise, dass die miR-9 den NF- κ B Signalweg über ihre Zielstruktur in Form der p50 mRNA supprimieren kann (285). Auf den Signalweg förderlich wirken hingegen die durch den NF- κ B-Weg induzierte verminderte Ausbildung der miRNA let-7 ein. Die Folge der verminderten let-7 Produktion ist die reduzierte Bildung der IL-6 mRNA bei gleichzeitig gesteigerter Zytokinproduktion (286). Weitere miRNAs stehen jedoch ebenfalls in Verdacht, eine Rolle in dem komplexen Prozess zu spielen, so dass sich die Forschung noch in der Anfangsphase befindet.

Die ClueGO Auswertung machte deutlich, dass besonders zwei Cluster durch die miRNAs let-7d und miR-22 angesprochen werden. Das erste Cluster befasst sich mit der negativen Regulation des T-Zell-Rezeptor Signalweges. Dabei ist bereits über Studien belegt, dass der T-Zell-Rezeptor Signalweg an der Entwicklung eines Morbus Crohn ganz entschieden beteiligt ist. Niesner et al. (287) konnte beispielsweise darlegen, dass Th1 Effector Memory-Zellen über den STAT4 und den T-Zell-Rezeptor (TCR) Signalweg aktiviert, eine vermehrte Aktivierung des NFAT und NF- κ B-Signalweges aufweisen. Die Folge sind eine vermehrte Expression von proentzündlichen Zytokinen und damit die Einleitung einer Entzündungsreaktion. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass bei einer mehrfachen Aktivierung dieser Th1-

Effector Memory-Zellen über den TCR-Rezeptor eine vermehrte Expression des *twist1* Gen auftrat, welches wiederum kontrollierend auf die Entzündungsreaktion und die Zytokinproduktion durch Hemmung des NF- κ B-Signalweges einwirkt.

Das zweite Cluster dreht sich um die T-Zell-Reifung im Thymus. Im Gegensatz zu den B-Zell-Funktionsstörungen lassen sich keine Aussagen zu einer Assoziation zwischen dem Auftreten von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und angeborenen selektiven T-Zell-Funktionsstörungen wie etwa beim DiGeorge-Syndrom finden. Besonders Funktionsstörungen im Reifungsprozess von T-Zellen im Thymus waren daher noch nicht Gegenstand von Pathogeneseuntersuchungen bei Morbus Crohn. Jedoch zeigt das Review von Mark et al. (288) dass Entzündungen des Darmes mit T-Zell-Funktionsstörungen einhergehen. Es wurden dazu klinische Fallstudien, Reviews und Fallberichte von Patienten mit Störungen der T-Zell-Funktion analysiert. Aufgenommen wurden Patienten mit dem IPEX-Syndrom (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, early onset enteropathy, X-linked inheritance), welches eine Störung in der T-Zell-Differenzierung und Aktivierung durch eine Mutation im Bereich des *FOXP3* Gen darstellt, dem Hyper-IgM-Syndrom, welches mit einer Mutation des CD40 Moleküls einhergeht, sowie Patienten mit HIV oder bei Patienten mit Melanomen oder Prostata-Carzinomen unter Therapie mit anti-CTLA4 Antikörpern. Das Ergebnis der Untersuchung war der Nachweis, dass es im Rahmen der mit diesen Erkrankungen einhergehenden T-Zell-Störungen zu Entzündungen im Darm kommt und meist eine Kaskade weiterer Immunreaktionen, wie der B-Zell-Aktivierung, ins Rollen kommt.

5.2.5 miRNA Expression im terminalen Ileum

5.2.5.1 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des terminalen Ileums im Rahmen der verbundenen Analyse

Im Vergleich von gesundem Kolon zu entzündetem terminalen Ileum innerhalb desselben Patienten konnte eine deutlich gesteigerten Expression um das knapp 8-fache der miR-424 festgestellt werden, wobei jedoch gleichzeitig auch eine sehr große Streuung der Expression dieser miRNA auffiel. Ebenfalls hoch signifikant überexprimiert ist die miR-30e. Die miRNAs miR-185 und miR-374b wiesen zwar Veränderungen im Expressionsverhalten auf, jedoch waren ihre Spannweiten derartig groß, dass keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte. Außerdem war besonders in Bezug auf die miR-185 das Problem aufgetreten, dass auf ein deutlich kleineres Kollektiv von $n = 4$, statt $n = 8$ Patienten zurückgegriffen werden

musste, da bei vier Proben zu starke Verunreinigungen im Isolationsprozess der miRNA aufgetreten waren. Systemische Fehler der Messung oder des Analyseverfahrens können weitestgehend ausgeschlossen werden, zumal sich während desselben Messversuches andere miRNAs als nicht verändert darstellten. Auf Grund fehlender Publikationen zum Expressionsverhalten dieser miRNAs zwischen gesunden und entzündeten Darmstücken aus einem Patienten, ist eine weiterführende Diskussion zum aktuellen Zeitpunkt nicht möglich.

5.2.5.2 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des terminalen Ileums im Rahmen der unverbunden Analyse

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt die Untersuchung der miRNA-Expression innerhalb des Gesamtkollektives. Sind nun sowohl die miR-185 ($p = 0,005$) als auch die miRNA miR-424 ($p = 0,013$) neben der miR-374b ($p = 0,052$) signifikant verändert, kann die miR-30e ($p = 0,09$) das Signifikanzlevel nicht mehr erreichen. Besonders die miRNA miR-185 ist um das rund 35fache deutlicher überexprimiert als die miRNAs miR-424 (rund 10fache), miR-374b (rund 5fache) und die miRNA miR-30e (rund 3fache). Dass die miR-30e das Signifikanzniveau in dieser Untersuchung trotz einer Überexpression um das fast 3fache nicht erreicht, liegt an der Feststellung mehrerer Ausreißer, welche jedoch auf Grund fehlender Hinweise für systemische Fehler nicht ausgeschlossen werden konnten. Auch ist nicht sicher, inwiefern die jeweils erhaltene medikamentöse Therapie mit Mesalazinen ($n = 4$), Immunmodulatoren wie Azathioprin ($n = 6$) und Biologics ($n = 1$) das ursprünglich unter Entzündung exprimierte miRNA-Level der miR-30e reduziert und somit vom Erreichen des Signifikanzlevels abgehalten hat.

Ein weiterer kritischer Aspekt in dieser Untersuchung ist die Betrachtung von zwei unterschiedlichen Gewebetypen aus der Funktionseinheit Darm in Form des Kolons im Vergleich zum terminalen Ileum. Hierbei ist bekannt, dass sowohl die bakterielle Kolonisation (72) sowie die daraus resultierende Immunsituation, als auch die Funktion und der histologische Aufbau dieser Gewebearten verschieden sind (73). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass etwaige Veränderungen der miRNA-Situation aus der Gewebesituation resultieren. Jedoch muss dennoch diese mögliche Fehlerquelle akzeptiert werden, da kein adäquates, aus demselben Patienten stammendes Vergleichsgewebe zu erhalten war.

5.2.5.3 Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten miRNA-Expressionsunterschiede im Bereich des terminalen Ileums

Für das terminale Ileum lässt sich somit im Rahmen der Entzündungsreaktion bei Morbus Crohn zusammenfassend darstellen, dass unter den untersuchten miRNAs die miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 mit gesteigerten Expressionswerten einhergingen.

5.2.5.4 Vergleich mit der Literatur

Die Untersuchung der in der Literatur vorhandenen Publikationen zum Expressionsverhalten von miRNAs innerhalb des terminalen Ileums bei Morbus Crohn führte lediglich zu einer verwertbaren Publikation (vgl. *Tabelle 33*). Hierbei handelte es sich erneut um die bereits unter 5.2.4.4. beschriebene Veröffentlichung von Wu et al., welcher darlegte, dass es im Vergleich von gesundem terminalen Ileum der Kontrollgruppe (n = 6) zum entzündeten terminalen Ileum der Patienten mit Morbus Crohn (n = 6) zu einer Expressionssteigerung der miRNAs miR-16, miR-21, miR-223 und miR-594 kommt. Die Gruppengrößen fielen dort somit etwas kleiner als in dieser Arbeit aus (Kontrollen n = 5, Morbus Crohn Patienten n = 11). Auffällig ist, dass dennoch keine der in dieser Arbeit identifizierten miRNAs als verändert bei Wu et al. beschrieben wurden, wobei jedoch leider nicht nachvollzogen werden konnte, welche miRNAs initial von Wu et al. untersucht wurden. Somit besteht die Möglichkeit, dass die hier identifizierten miRNAs von der Arbeitsgruppe Wu et al. nicht erfasst worden sind.

Material	Untersuchung	miRNA	Quelle
Human	terminales Ileum	gesunde Kontrolle vs aktiver MC miR-16, miR-21, miR-223, miR-594	(252)

Tabelle 33 In Biopsien des terminalen Ileum nachgewiesene miRNA-Veränderungen bei Morbus Crohn; grün = im Vergleich zum Kontrollgen in der Expression gesteigert

Da es keine Veröffentlichung zum Expressionsverhalten der miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 im Bereich des terminalen Ileums gibt, wurde die Literaturrecherche auf allgemein beschriebene Veränderungen dieser miRNAs im Zusammenhang mit einem Morbus Crohn ausgeweitet.

Es zeigt sich dabei, dass Zahm et al. eine Überexpression der miR-30e im Rahmen von Serumuntersuchungen bei Kindern mit aktivem Morbus herausfand (259). Dazu untersuchte er 46 Seren von Kindern mit Morbus Crohn im Alter von 13,7 Jahren mit einer Standardabweichung von 3 Jahren und 32 Seren von gesunden Kindern im Alter von 13,1 Jahren mit einer Standardabweichung von 4,1 Jahren. Eine gesteigerte miRNA Expression fand er neben der miR-30e ebenfalls

bei den miRNAs let-7b, miR-16, miR-20a, miR-21, miR-93, miR-106a, miR-140, miR-192, miR-195 miR-484. Zusätzlich konnte er aufzeigen, dass es nach 6 monatiger Therapie zu einer Suppression der miRNA Expression der miRNAs miR-484 und miR-195 kam.

Unter den Suchbegriffen „miR-185 AND Crohns disease“, „miR-185 AND IBD“ und „miR-185 AND Kolon“ ließen sich in PubMed keine Publikationen finden, welche eine direkte Assoziation zwischen Expressionsveränderung der miR-185 und chronisch-entzündlichen Darmerkrankung ermöglichen. Jedoch gibt es mehrere Publikationen, welche belegen, dass ein Zusammenhang zwischen der miR-185 Expression und der Entstehung von kolorektalen Karzinomen besteht. Liu et al. konnte an Hand von Zellkulturen etwa aufzeigen, dass die miR-185 die Proteinlevels von RhoA und Cdc42 reduziert (289). Beide Proteine sind entscheidend für die Zellproliferation und die Fähigkeit Metastasen bei kolorektalen Karzinomen zu bilden. Somit dient die miR-185 als negativer Regulator mit letztlich der Fähigkeit die Invasivität und Proliferationsfähigkeit der Tumorzellen zu steuern. Da im Rahmen von Morbus Crohn die Inzidenz von kolorektalen Karzinomen ansteigt, ist ein protektiver Zusammenhang möglicherweise gegeben.

Auch die miR-424 wird in der Literatur nicht direkt mit dem Pathogeneseprozess von Morbus Crohn in Zusammenhang gebracht, sondern als ein die Angiogenese und Chemotaxis fördernder Faktor beschrieben. Dazu inhibiert sie die Expression von CUL2 und stabilisiert die Expression von HIF-1 α (290). Es kommt ebenso in gesteigerter Expression beim Kolonkarzinom vor (291).

5.2.5.5 Theoretische Abhandlung der gemeinsam Wirkungsweise der miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424

Die Datenbankanalyse zu den miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 erbrachte für die Bereiche Lokalisation und Funktion keine neuen Erkenntnisse, sondern sie spiegeln wie bereits beschrieben, die normale Verteilung der miRNAs innerhalb der Zelle wieder. Anders hingegen verhält es sich mit den Proteinanalysen. In der Literaturdiskussion wurde bereits nahegelegt, dass Funktionsstörungen im Bereich der intestinalen Barriere eine bedeutende Stellung im Pathogeneseprozess von Morbus Crohn einnehmen. **CD40-CD40L-Interaktionen** in diesem Bereich stellen eine dieser Funktionsstörungen dar, da sie proinflammatorische Pathways in Immun- und nicht-Immunzellen initialisieren können (292). TNF- α und INF- γ stellen Zytokine dar, welche über Aktivierung des NF- κ B-Signalweges die

Expression von CD40-Molekülen steigern und dadurch die Schwere der Entzündungsreaktion beeinflussen. Eine Regulation des CD40-Moleküls durch die miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424 wird durch die durchgeführten Datenbankauswertungen zu den am häufigsten regulierten Proteinen nahegelegt und durch die Pathwayanalysen mit besonderer Betonung der positiven Regulation der I-kappaB kinase/NF-kappaB Kaskade unterstrichen.

In der Literaturdiskussion wurde ebenfalls auf den Stellenwert der „unfolded protein response“ im Rahmen von Stressreaktionen hingewiesen. Eine enge Verknüpfung zwischen der Ausbildung von Stress-Granula und der „unfolded protein response“ könnte durch das Protein TDRD3 bestehen (293). In einem Review von Thomas MG et al. wird darauf verwiesen, dass Stress-Granula bedingt durch zellulären Stress gebildet werden und eine weitreichende Translationshemmung über mehrere Pathways bewirken, worunter unter anderem die Phosphorylierung und somit Inaktivierung des Schlüsselfaktors eIF2 α als die Translation einleitender Faktor fällt (294). Die Folge von dessen Beeinflussung ist eine Förderung der Entzündungsreaktion und die Einleitung von Apoptoseprozessen.

Im Rahmen der Auswertung zeigte sich außerdem, dass die Proteine **SAT1**, **APTIX** und **REV3L** (295) bei einem Kolonkarzinom vermehrt zu finden sind. Da auch Morbus Crohn in den durchgeführten epidemiologischen Studien ein höheres Risiko zur Entwicklung von Kolonkarzinomen aufwies, lässt sich ein möglicher Zusammenhang mutmaßen, welcher jedoch ebenfalls noch über experimentelle Studien bestätigt werden muss.

Im Rahmen der ClueGo Auswertung wurden 3 Cluster der Immunsystempathway-Beeinflussung deutlich. Wie bereits in der Clusteranalyse zum Morbus Crohn im Bereich des Kolons beschrieben, kommt es erneut zur Aktivierung der positiven Regulation des T-Zell Rezeptor Signalweges mit Aktivierung der NF-kB-Kaskade (287).

Das zweite Cluster stellt die These auf, dass eine positive Regulation des Klassenwechsels von Antikörpern zu IgG-Antikörpern im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung erfolgt. Unterstützung findet diese These zum einen durch eine Untersuchung an Knockout Mäusen. Hierbei wurden zwei in keim- armer Umgebung lebende Mausgruppen gebildet, wobei in beiden Gruppen das Gen für den T-Zell-Rezeptor α nicht mehr vorhanden war. Die Immunglobulin-Level von Antikörpern wurden im Serum beider Mausgruppen untersucht, wobei

die erste Gruppe bestehend aus den älteren Mäusen bereits eine manifeste chronische Entzündung des Darmes entwickelt hatte, während die andere Gruppe noch auf dem Weg zu einer solchen war. Das Resultat war die Feststellung, dass im Rahmen des Entzündungsprozesses und der damit einhergehenden Zytokin-imbalance eine vermehrte Bildung von B-Zellen erfolgte, welche wiederum eine gesteigerte Produktion von Antikörpern aufwiesen. Dabei fand ein Switch der Antikörperproduktion statt, so dass vor allem vermehrt Antikörper der IgG1 und IgG2 Subklassen gebildet wurden (296). Problematisch an diesem Experiment sind jedoch die Aspekte, dass es sich einerseits um eine Mausstudie handelt, welche eine eins-zu-eins Übertragbarkeit nicht garantieren kann. Andererseits handelte es sich um gezielt mutierte Mäuse, deren Erkrankung zwar eine Entzündung des Darmes entsprach, aber nicht mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung gleichzusetzen ist.

Zum anderen konnte aber auch eine humane Untersuchung zeigen, dass es zu einer vermehrten Bildung von IgG2 im Rahmen eines Morbus Crohn kommt (297). Es wurden dazu von 68 Patienten mit Morbus Crohn und von 66 Patienten mit einer Colitis ulcerosa die Serumkonzentrationen der Immunglobuline IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA und IgM im Vergleich zueinander analysiert, wobei bereits im Vorfeld eine gesteigerte Immunglobulinkonzentration im Vergleich zu gesunden festgestellt wurden. Während bei der Colitis ulcerosa hohe IgG1-Level gemessen werden konnten, fielen beim Morbus Crohn vor allem hohe IgG2-Level auf. IgG2-Globuline sind dabei besonders gegen Polysaccharidantigene etwa in Rahmen von Infektionen mit bekapselten Bakterien gerichtet (Hubert, A. et al.: „Humorale Immundefizienz I: Antikörpermangelsyndrome ohne bekannte genetische Defekte“. In: „ImmunDefektCentrum der Charité“. Stand: 15.09.2012. <http://www.immundefekt.de/hid.shtml>). Das gerade der IgG2-Anteil ansteigt, ist mit einer kürzlich erschienen Veröffentlichung von Harmsen et al. (298) vereinbar, welcher zeigte, dass Crohn Patienten mehr IgG-bindende Bakterien vom Escherichia coli Typ aufwiesen. Er untersuchte dazu das Serum und die Stuhlproben von 23 Morbus Crohn und 11 gesunden Patienten auf das Immunglobulin IgG. Er stellte fest, dass die Morbus Crohn Patienten eine höhere Konzentration an IgG-bindende Bakterien, vor allem von Escherichia Coli Typ, aufwiesen. Dieses führte er auf die gestörte Schleimhautbarriere zurück, wodurch es zum ei-

nen zu einer abzuwehrenden Invasion von Darmkeimen bei gleichzeitig bestehender Leckage von IgG kommt.

Das dritte Cluster hebt die Bedeutung der positiven Regulation des MyD88 abhängigen Toll-Like Rezeptor Signalweges hervor. Ein gutes Review zu dem Thema stellt die Veröffentlichung von Santaolalla und Abreu dar, aus dem folgende Aspekte hervorgehen (299): Toll-Like Rezeptoren dienen als Sensoren und können Immunantworten etwa in Form von der Produktion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden einleiten. Außerdem werden diese Rezeptoren für die Aktivierung von dendritischen Zellen und Makrophagen im Bereich der Darmschleimhaut benötigt. Über den MyD88-Signalweg können die aktivierten Toll-like Rezeptoren intraepitheliale T-Lymphozyten zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden anregen. Bezogen auf den Dünndarm wurde eine vom MyD88 abhängige Rekrutierung von Mastzellen gezeigt. Außerdem wird durch den Signalweg die Trennung der Darmflora vom Epithel durch die Beeinflussung der Schleimschichtdicke reguliert. Im Rahmen eines Morbus Crohn konnte eine Zunahme der Schleimproduktion bei gleichzeitiger Abnahme der Defensin und Peptid Konzentration festgestellt werden (89).

5.2.6 miRNA-Expression bei Colitis ulcerosa

5.2.6.1 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der verbundenen Analyse

Hatten sich für die Colitis ulcerosa im Rahmen der Array-Analysen Expressionsunterschiede für die miRNAs let-7d und miR-185 gezeigt, konnten diese Unterschiede innerhalb der Untersuchung am selben Patienten nicht mehr nachvollzogen werden. Dieses kann daran liegen, dass eine um den Faktor vier größere Anzahl an Proben analysiert wurde, und sich dadurch mögliche Unterschiede nivelliert haben. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liegt im miRNA-Array-System, welches, auf Grund seines hohen Potenziales für falsch positive Werte, anfällig ist (274), so dass eine weitere Überprüfung der Ergebnisse notwendig wurde.

5.2.6.2 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons im Rahmen der unverbundenen Analyse

Auch in der an einem größeren Kollektiv durchgeführten Expressionsanalyse zeigte sich lediglich eine nicht-signifikante Tendenz für eine gesteigerte Expression der let-7d. An Hand der graphischen Darstellungen kann man jedoch auf der anderen Seite erkennen, dass die Boxplots der miRNAs let-7d, miR-424 bei den Colitis ulcerosa und der Boxplot der miR-185 bei der Kontrollgruppe im großen Kol-

ektiv eine große Spannweite aufweist, so dass die Erfassung eines noch größeren Kollektives gegebenenfalls eine Präzisierung und dadurch mehr Klarheit bezüglich einer Signifikanz der Expressionsunterschiede dieser miRNAs liefern würde. Des Weiteren ist zu beachten, dass im Rahmen der Expressionsanalyse in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad Expressionsunterschiede der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 gefunden werden konnten. Damit ist es möglich, dass diese miRNAs erst im fortgeschrittenen Erkrankungsprozess eine Rolle spielen, in der initialen Gesamtschau jedoch in ihrer Bedeutung überschattet werden. Deutliche Unterschiede zwischen dem Expressionsverhalten der miRNAs let-7d ($p < 0,001$), miR-185 ($p = 0,022$), miR-374b ($p = 0,04$) und miR-424 ($p < 0,001$) ließen sich im Vergleich der Colitis ulcerosa-Patienten zu den Morbus Crohn Patienten erkennen, welche die These stützen, dass es sich bei den beiden Erkrankungen trotz vieler Gemeinsamkeiten um Prozesse unterschiedlicher Genese handelt.

5.2.6.3 Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten miRNA-Expressionsunterschiede im Kolon von Colitis ulcerosa Patienten

Zusammenfassend wurden auf Grund der mehrfachen Expressionsunterschiede in den einzelnen Analysen die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 als für die Erkrankung Colitis ulcerosa von Bedeutung gewertet. Alle drei miRNAs traten dabei im Rahmen des Erkrankungsprozesses als überexprimiert auf.

5.2.6.4 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

Wie der *Tabelle 34* zu entnehmen ist, wurde bereits eine Vielzahl an Experimenten unternommen, um das Expressionsverhalten der miRNAs bei Colitis ulcerosa zu untersuchen.

Material	Untersuchung		miRNA	Quelle
Human	Sigmoideum	gesunde Kontrolle vs aktive Colitis ulcerosa	miR-16, miR-21, miR-23a, miR-24, miR-29a, miR-126, miR-195, let-7f, miR192, miR-375, miR-422b	(258)
Human	Kolon	gesunde Kontrolle vs aktive Colitis ulcerosa	miR-21, miR-155	(300)
Human	Kolon	gesunde Kontrolle vs aktive Colitis ulcerosa	miR-7, miR-31, miR-135b, miR-223, miR-29a, miR-29b, miR-126*, miR-127-3p, miR324-3p, miR-188-5p, miR-25, miR-320a, miR-346	(257)
Human	Serum	gesunde Kontrolle vs aktive Colitis ulcerosa	miR-28-5p, miR-151-5p, miR-199a-5p, miR-340*, miRpls-E1271, miR-103-2*, miR-362-3p, miR-532-3p, miR-505*	(301)

Tabelle 34 In der Literatur beschriebene miRNA-Veränderungen bei Colitis ulcerosa; grün = überexprimierte miRNAs; rot = supprimierte miRNAs

Auffällig ist, dass keine der Publikationen die in dieser Arbeit identifizierten miRNAs ebenfalls als in ihrer Expression verändert beschrieben hat. Dieses hängt damit

zusammen, dass in jeder der Arbeiten andere Systeme mit anderen Schwerpunkten zum Einsatz gekommen sind, auf welche im Folgenden arbeitsspezifisch eingegangen wird:

In der ersten Publikation von Wu et al. aus dem Jahre 2008 (258) wurden jeweils 15 Biopsien aus dem Bereich des Sigmoideums von Patienten mit einer aktiven Colitis ulcerosa und von gesunden Patienten als Kontrollgruppe gewonnen. Zur Klassifizierung der Erkrankung und der Entzündungsaktivität wurde zusätzlich jeweils eine weitere Biopsie aus einem Umkreis von 10 cm entnommen und einer histopathologischen Untersuchung zugeführt. Die Isolation der TotalRNA erfolgte mit Hilfe des Triazol-Reagents, also auf Basis einer Methode mit Phenol-Guanidin-Isozyanaten, wodurch eine Vergleichbarkeit der miRNA-Expression in dieser Arbeit möglich wird. Wie bereits unter Morbus Crohn beschrieben, erfolgte eine initiale Microarray Untersuchung mit dem „NCode Multi-Species miRNA Microarray“ der Firma Invitrogen, wobei auf Grund einer defekten Verlinkung die Zusammensetzung der analysierten miRNAs mit diesem Array-System nicht abrufbar ist. Daher kann auch nicht verglichen werden, ob dieselben miRNAs wie in dieser Arbeit mit diesem System erfasst wurden. Im Rahmen der Microarray-Analyse wurden 18 miRNAs als in ihrer Expression verändert herausgearbeitet, von welchen 11 in der darauf folgenden Kontrollanalyse mittels quantitativer PCR bestätigt werden konnten. Knapp 1/3 der untersuchten miRNAs fiel somit auch in diesem System als falsch positiv reguliert auf.

In der Arbeit von Takagi et al. aus dem Jahre 2009 (300) konnten lediglich zwei miRNAs als überexprimiert herausgearbeitet werden. Nach Isolation der TotalRNA mit Hilfe auf einer Phenol-Guanidin-Isozyanaten basierten Methode untersuchte er initial zwei entzündete Kolon Biopsien von Colitis ulcerosa Patienten, welche bisher ausschließlich Sulfasalazine als Therapeutikum bekommen hatten und zwei gesunde Dickdarmbiopsien von gesunden Probanden. Zum Einsatz kam dabei das „NCode human miRNA microarrays V3“ Microarray-System der Firma Invitrogen. Über das System konnten zeitgleich 710 miRNAs analysiert und über die mitgeführte Software ausgewertet werden. Als relevant wurden Werte erachtet, deren Differenz im Gruppenvergleich eine Signifikanz von $P < 0,01$ aufwies. Es konnten somit 27 der 710 miRNAs die Kriterien erfüllen, wobei 20 der 27 miRNAs als unbekannte menschliche miRNA ausgeschlossen wurden. In der durchgeführten Kontrolluntersuchung an 12 floriden Dickdarmbiopsien von Colitis ulcerosa

Patienten und 12 Kontrollbiopsien von Kolonkarzinompatienten konnten letztlich nur die miRNAs miR-21 und miR-155 als „signifikant“ überexprimiert in der entzündeten Darmschleimhaut der Colitis ulcerosa Patienten nachgewiesen werden. Die Schwächen dieser Arbeit waren, dass ein nur sehr kleines Kollektiv untersucht wurde. Außerdem erfolgten keine näheren Angaben dazu, aus welchen Dickdarmabschnitten die jeweiligen Biopsien stammten. Zusätzlich stellten die Biopsien der Kontrollgruppe Dickdarmgewebe dar, welches aus dem Randgebiet von >5cm zu einem bestätigten Kolonkarzinom stammte, wodurch die Kontrollgruppe nicht zu 100% gesund war. Auch die Aussage einer Signifikanz ist gewagt, da ein viel zu kleines Kollektiv erfasst wurde und bereits das Microarray-System eine sehr hohe Fehlerquote aufwies.

Die dritte Arbeit von Fasseu et al. (2010) (257) beschäftigt sich zwar primär mit dem Expressionsverhalten der miRNAs im Rahmen einer Remission, jedoch werden in der Arbeit auch Daten zum Expressionsverhalten im Rahmen der floriden Entzündungsreaktion gezeigt. Analysiert wurden dazu acht entzündete Kolonbiopsien von Colitis ulcerosa Patienten und 10 Biopsien von gesunden Patienten, welche sich im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung der Koloskopie unterzogen haben. Die TotalRNA Isolation erfolgte mit dem TRIzolTM Reagenz der Firma Invitrogen und erfolgte somit auf Basis der Phenol-Guanidin-Isozyanat-Methode. Die Quantifizierung erfolgte mittels des ND-1000 NanoDrop Spektrophotometer und eine Reinheitskontrolle wurde mittels RNA Chips (Agilent RNA 6000 Nano Lab-Chip kit) durchgeführt. Es folgte eine Schrotschussanalyse mit Hilfe des TaqMan[®] MicroRNA Assay von Applied Biosystems, wobei eine Quantifizierung von 321 selbst ausgewählten reifen menschlichen miRNAs erfolgte. Als Kontrollgen wurden unterschiedliche RNAs getestet (U6, U24, U48, S18), wobei sich die U6 als die am besten Geeignete herausstellte. Als Ergebnis der Untersuchung wurden 13 miRNAs in ihrer Regulation als verändert herausgearbeitet. Somit entsprach die Vorgehensweise dieser Studie in weiten Teilen der Vorgehensweise in dieser Arbeit. Besser war die zusätzliche durchgeführte Qualitätskontrolle mit Hilfe der RNA Chips. Die Folge dieser Qualitätskontrolle war jedoch, dass von ursprünglich 18 gesammelten Colitis ulcerosa Biopsien und den 19 gesammelten Kontrollbiopsien lediglich 8 in der Colitis ulcerosa Gruppe und 10 in der Kontrollgruppe für die Analyse verwendet werden konnten. Ein Nachteil der Arbeit war, dass eine abschließende zweite Kontrollanalyse der identifizierten miRNAs in einem größeren Kol-

ektiv fehlte. Aus den Beschreibungen von Fasseu et al. geht des weiteren nicht klar hervor, welche miRNAs in ihrer Gesamtheit untersucht wurden. Ein Vergleich wird somit lediglich für die miRNAs-15a und miR-424 möglich, wobei beide miRNAs sowohl in dieser wie auch in der Arbeit von Fasseu et al. nicht in ihrer Expression verändert festgestellt worden sind.

5.2.6.5 Theoretische Abhandlung der gemeinsamen Wirkungsweise der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 im Rahmen einer floriden Colitis ulcerosa

Auch bei der Untersuchung der Lokalisation, der Funktion (nicht dargestellt) und des Pathways der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine ergaben sich bei der Betrachtung der Tortendiagramme keine wesentlichen Unterschiede. Im Rahmen der Proteinanalyse wird jedoch deutlich, dass besonders Prozesse der Zellverknüpfung, der Immunreaktion, der Apoptose und des Umgangs mit oxidativem Stress und folglich Antwortreaktionen auf DNA-Schäden beeinflusst werden.

Im Rahmen der Zellverknüpfung und der Immunreaktion heben sowohl die Datenbankauswertungen zu den 10 am häufigsten regulierten Proteinen, wie auch die ClueGO Analyse das Protein **CD40** hervor. Das Molekül gehört zur TNF-Rezeptor-Familie 5. Sowohl für Morbus Crohn als auch für die Colitis ulcerosa (302) wurde die Relevanz dieses auf über 11 unterschiedlichen Wegen durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteins hervorgehoben. Bei dem CD40 Protein handelt es sich um einen Trimer auf der Zelloberfläche von Zellen des Immunsystems (B-Zellen, Dendritische Zellen, Makrophagen, Monocyten, et cetera) als auch auf Zellen ohne Immunsystembezug (epitheliale Zellen, endotheliale Zellen, mesenchymale Zellen). Daher wird die CD40-Interaktion als wichtiger Bestandteil des multidirektionalen Modells der Zell-Zell-Interaktion angesehen, nach welchem eine reziproke Interaktion zwischen allen Zellen und der extrazellulären Matrix stattfindet (303). Mit der Aktivierung des CD40-Rezeptors erfolgt eine transmembranöse Signaltransduktion mit anschließender Aktivierung von intrazellulären Kinasen und Transkriptionsfaktoren. Entscheidende Elemente sind dabei Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), der Transkriptionsfaktor nuclear factor- κ B (NF- κ B) sowie STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) (304). Die Aktivierung dieser Systeme hat im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung die Folge, dass es durch die abnormale Interaktion von nichtimmunologischen Zellen (i.b. Epithelzellen) mit immunologischen Zel-

len (i.b. T-Zellen) zu einer selbsterhaltenden Aktivierung des chronischen Entzündungsprozesses kommt, indem immerzu neue T-Zellen antigenunabhängig ange- lockt und aktiviert werden (305). Außerdem kommt es zu einer Hyperadhäsion von Leukozyten, wodurch man die Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses zu erklären versucht (303). Als Aktivator wird vor allem die darmeigene Flora ange- sehen. In der Summe wird dadurch auch das große Aufkommen der polymorph- kernigen Leukozyten und Immunglobulin sekretierenden Plasmazellen in der Schleimhaut von Colitis ulcerosa Patienten erklärt (306). Des weiteren wird durch die CluGO Darstellung veranschaulicht, dass es über den CD40-Pathway zu einer positiven Regulation des Klassenswitches von Immunglobulinen zu Globulinen vom IgG-Typ kommt. Philipsen et al. (297) zeigten, dass ein besonders großer Anteil an IgG1 im Serum der Colitis ulcerosa Patienten feststellbar ist. IgG1 Globu- line sind dabei Globuline, welche besonders gegen Proteinantigene gerichtet sind und bei pyogenen Infektionen isoliert oder in Kombination mit einem IgG3 Mangel auftreten (<http://www.immundefekt.de/hid.shtml>; zuletzt abgerufen am 15.08.2012). Der Gesamtkontext dieses Prozesses wird am besten in einer aktuel- len Veröffentlichung von Furrie et al. beschrieben (306). In dieser wurden von 9 Patienten mit einer Colitis ulcerosa und von 9 gesunden Probanden jeweils eine Schleimhautbiopsie aus der vorderen Wand des Rektums bei einer Tiefe von 5 – 10 cm entnommen und auf die bakterielle Zusammensetzung untersucht. Er fand heraus, dass im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Bifidobakterien und Prevo- tella, dafür jedoch deutlich mehr Peptostreptokokken im Darm dieser Colitis ulce- rosa Patienten vorkommen. Parallel untersuchte er das Serum dieser Patienten auf die IgG und IgA Konzentration und stellte dabei eine deutlich höhere Konzent- ration an IgG im Serum der Patienten fest. Im nächsten Schritt untersuchte er, ob die IgG-Antwort spezifisch auf die Darmkeime ist. Auch hierbei wurde eine Spezifi- tät der IgG-Antwort gegen die Peptostreptococcen anaerobius und Enterococcus faecalis deutlich. Darüber hinaus wurde die Bindungsfähigkeit von gereinigtem IgG an die Darmflora gemessen, worauf sich zeigte, dass besonders bei den Colitis ulcerosa Patienten die IgG-Bindung zu 100% besser stattfand als in der Kontroll- gruppe, bei Morbus Crohn oder auch Infektiösen Patienten. Im Rahmen einer im Anschluss durchgeführten Messung der durch die Antikörper initiierten Immunant- wort fand die Gruppe heraus, dass die stärkste durch die gebundenen Antikörper hervorgerufen Immunantwort bei den Colitis ulcerosa Patienten zu finden war, be-

sonders auf die gebundenen Immunglobuline IgG1 gegen *Peptostreptococcus anaerobius*. Die Folge war eine stärker ausgebildete oxidative Antwort auf die Darmflora. Der Autor endete mit dem Hinweis, dass im Rahmen der Rückkehr der peripheren IgG produzierenden B-Zellen von der rektalen Schleimhaut in das Blut-system eine Ausbreitung des Entzündungsgeschehens möglich gemacht werde. Dieses erklärte er damit, dass IgG-Globuline über den FcRn Rezeptor in das Darmlumen hinein gelangen, dort mit Antigen beladen und aus diesem mit dem gebundenen Antigen wieder in die Peripherie hinaus transportiert werden können, um schließlich erneut eine Immunantwort auszulösen.

Ebenfalls den NF- κ B- und MAPK-Signalweg beeinflussend ist das **PLEKHG5**-Protein, zu dem es jedoch aktuell lediglich eine Arbeit aus der Neurologie gibt, welche die Beeinflussung des NF- κ B- und MAPK-Signalweges belegt (307).

Die Pathways der Apoptose, Immunreaktion und des oxidativen Stress werden unter anderem durch das gemeinsam regulierte SMOX-Protein beeinflusst. In einer Arbeit von Hong et al. konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der Colitis ulcerosa eine **vermehrte Expression des Enzyms SMOX (Spermine oxidase)** im Bereich der Lamina propria erfolgt (308). Die Funktion der Spermine Oxidase liegt in der Oxidation von Spermine zu Spermidine. Spermine ist ein Protein mit inhibitorischer Funktion für proinflammatorische Zytokine und zugleich für die Translation der inducible NO-Synthase (iNOS) verantwortlich. Spermidine hingegen wird zur Aufrechterhaltung der intrazellulären Polyamin-Homöostase benötigt, indem es die Umwandlung von L-Ornithin zu entsprechenden Polyaminen begünstigt. Polyamine regulieren den Entzündungsprozess, steuern das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung. Aus Forschungen aus dem Bereich der Prostatakarzinome weiß man jedoch auch, dass sie an der Karzinogenese beteiligt sind. Ein Nebenprodukt aus der Umwandlung von Spermine zu Spermidine ist Wasserstoffperoxid, welches besonders durch seine Lokalisation im Nukleus oxidativen Stress auslöst. Die Folgen sind DNA-Schädigungen mit erneuter Begünstigung von karzinogenen Entartungen. Zusätzlich kommt es durch den oxidativen Stress in Makrophagen zu einer gesteigerten Apoptose dieser mit folglich Freisetzung von Zytokinen und einer gesteigerten lokalen Entzündungsreaktion. Mit dem vermehrten Untergang von Makrophagen und der gleichzeitig gesteigerten Anlockung zytotoxischer Immunzellen wird ein lokales immunologisches Ungleichgewicht bewirkt, welches eine adäquate Bekämpfung der zusätzlich bestehenden Darmkeime

verhindert. Damit begünstigt es als ein weiterer Faktor den Pathogeneseprozess der Colitis ulcerosa.

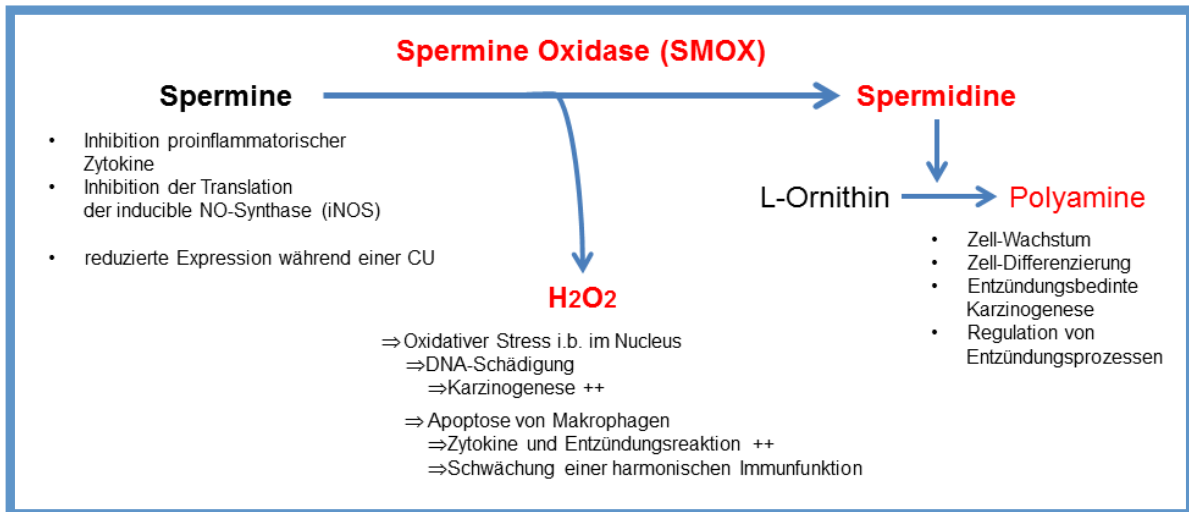


Abbildung 36 Pathway und Funktion der Spermine Oxidase (SMOX)

Die Datenbankanalysen sowie die ClueGO-Darstellung verweisen zusätzlich auf das Protein **LCK (lymphocyte-specific protein tyrosine kinase)**, wobei für dieses aktuell keine Untersuchung zu seiner Bedeutung im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen existieren. LCK beeinflusst eine Vielzahl von Funktionen aus dem Bereich der Apoptose sowie der Immunregulation (309): Zum einen spielt dieses Protein eine Schlüsselrolle in der Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen. Als Folge der T-Zell-Rezeptor-Stimulation phosphoryliert LCK unterschiedliche Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors und setzt dadurch unterschiedliche Second-Messenger Kaskaden wie etwa Phospholipase C- und MAPK-Signalwege sowie unterschiedliche Transkriptionsfaktoren in Gang. Als Antworten folgen Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Entzündungsreaktionen und Apoptoseprozesse. Zum anderen beeinflusst LCK den mitochondrialen Apoptose-Weg, indem es mit dem Verlust des transmembranären Potenzials der Mitochondrien die Ausschüttung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom C begünstigt. Die Folgen sind auch hierbei erneut Entzündungsreaktionen und Apoptoseprozesse. Eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom C in Verbindung mit einer Colitis ulcerosa konnte bereits bewiesen werden (310). Zusätzlich lässt sich beobachten, dass mit steigender Entzündungsaktivität, die Überexpression der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 einhergeht. Dabei ist jedoch nicht sicher zu differenzieren, ob die Entzündungsaktivität auf Grund der miRNA-Überexpression ansteigt, oder ob die miRNA-Überexpression

als Folge der hohen Entzündungsaktivität zur Gegenregulation vermehrt gebildet wird.

In der ClueGO-Darstellung wird ebenfalls erneut die positive Regulation der MyD88-abhängigen toll-like Rezeptor Signalkaskade hervorgehoben. Da auf die Wirkungsweise dieses Signalweges bereits unter Morbus Crohn unter Kapitel 5.2.5.5. eingegangen wurde, wird auf eine erneute Wiederholung verzichtet. Die Relevanz dieses Pathways wird in den Studien besonders in Hinblick auf die Tumorentstehung bei Colitis ulcerosa gesehen, wobei die Mausexperimente vor allem im Vergleich zu MyD88 $-/-$ Mäusen belegen (311).

5.2.7 miRNA-Expression im Rahmen einer Remission eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa

5.2.7.1 Diskussion der Ergebnisse zur miRNA-Expression im Bereich des Kolons und deren Verhalten in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad

Im Kollektivvergleich zeigten sich Expressionsveränderungen bei den miRNAs miR-18a und miR-185 sowohl bei einem ruhenden Morbus Crohn als auch bei einer ruhenden Colitis ulcerosa. Veränderungen mit knapp verpasster statistischer Signifikanz wiesen zusätzlich die miRNAs miR-15a und miR-30e im Rahmen der Remission auf. Auffällig war, dass im Rahmen einer steigenden Entzündungsaktivität die miRNA miR-18a an Bedeutung verlor, wohingegen die miRNA miR-185 zu jedem Stadium einen deutlichen Expressionsunterschied im Vergleich der Colitis ulcerosa Gruppe zur gesunden Kontrollgruppe sowie zur Colitis ulcerosa Gruppe in Remission aufwies. Zusätzlich fiel auch auf, dass mit steigendem Entzündungsgrad auch der Expressionsunterschied zwischen der Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Gruppe bei der miR-185 deutlicher wurde. Bei zusätzlicher Betrachtung der Expressionslevel können zwei Thesen aufgestellt werden: Die erste These lautet, dass ein supprimiertes Vorliegen der miRNAs miR-18a und miR-185 dazu notwendig ist, die Remission aufrecht zu erhalten, da beide miRNAs ein proinflammatorisches System bedienen. Alternativ könnte die Expressionssteigerung der beiden miRNAs jedoch auch bedeuten, dass der Körper diese im Rahmen der Gegenregulation vermehrt bildet, um durch antiinflammatorische Eigenschaften die Entzündungsaktivität einzudämmen. Die Datenbankanalyse sollte dazu beitragen, eine der These zu stützen

5.2.7.2 Zusammenfassung der in dieser Arbeit entdeckten miRNA-Expressionsunterschiede im Bereich des Kolons

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die miRNAs miR-18a und miR-185 im Vergleich zum Vergleichsgen RNU-6b im Rahmen der Remission bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen ein supprimiertes Expressionsverhalten im Kolon aufwiesen.

5.2.7.3 Vergleich mit der Literatur

Die in der *Tabelle 35* dargestellten Daten stammen von der bisher ausführlichsten Studie zum Expressionsverhalten der miRNAs bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Rahmen einer Remission von Fasseu et al. (2010) (257).

Material	Untersuchung	miRNA	Quelle
Human	Kolon	gesunde Kontrolle vs Colitis ulcerosa in Remission	miR-196a, miR-29a, miR-29b, miR-126*, miR-127-3p, miR-324-3p, miR-188-5p, miR-25, miR-320a, miR-346
Human	Kolon	gesunde Kontrolle vs Morbus Crohn in Remission	miR-9*, miR-30a*, miR-30c, miR-223, miR-25a, miR-29b, miR-30b, miR-34c-5p, miR-126*, miR-127-3p, miR-133b, miR-155, miR-196a, miR-324-3p, miR-21, miR-22, miR-29c, miR-31, miR-106a, miR-146a, miR-146b-3p, miR-150
Human	Kolon	Colitis ulcerosa in Remission vs Morbus Crohn in Remission	miR-150, miR-196b, miR-199a-3p, miR-199b-5p, miR-223, miR-320a

Tabelle 35 In publizierten Arbeiten festgestellte miRNA-Expressionsveränderungen im Rahmen einer Remission einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung vom Typ Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa; grün = überexprimierte miRNA, rot = supprimierte miRNA; Beurteilung der Expression im Vergleich zum Referenzgen U6

Es erfolgte die Analyse von acht Kolonbiopsien von Colitis ulcerosa Patienten, von acht Kolonbiopsien von Morbus Crohn Patienten und zehn Biopsien von gesunden Patienten. Alle Biopsien stammten dabei von histopathologisch und endoskopisch bestätigtem entzündungsfreiem Gewebe. Nach Isolation der TotalRNA auf Basis der phenol-guanidin-Isozyanat-Methode, erfolgte die Quantifizierung mittels des ND-1000 NanoDrop Spektrophotometer. Eine Reinheitskontrolle wurde mittels RNA Chips (Agilent RNA 6000 Nano LabChip kit) durchgeführt. Es fand eine Schrotschussanalyse mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Assay von Applied Biosystems statt, wobei eine Quantifizierung von 321 reifen menschlichen miRNAs erfolgte. U6 wurde dabei als Kontrollgen verwendet. Als Ergebnis der Untersuchung wurden 13 miRNAs in ihrer Regulation als verändert herausgearbeitet. Somit entsprach die Vorgehensweise dieses Experimentes in weiten Teilen der Vorgehensweise in dieser Arbeit. Zu beachten ist jedoch, dass im Rahmen der zusätzlich durchgeführten Qualitätskontrolle mit Hilfe der RNA Chips einige Proben ausgeschlossen werden mussten. So konnten von den ursprünglich 24 gesammel-

ten Morbus Crohn Biopsien lediglich 8 verwendet werden. Ähnliche Zahlen ergaben sich bei der Colitis ulcerosa (8 von 18 Biopsien) und der Kontrollgruppe (10 von 19 Biopsien). Ein Nachteil der Arbeit war, dass eine abschließende zweite Kontrollanalyse der identifizierten miRNAs in einem größeren Kollektiv fehlte. Aus den Beschreibungen von Fasseu et al. geht desweiteren nicht klar hervor, welche miRNAs in ihrer Gesamtheit untersucht wurden. Ein Vergleich wird somit lediglich für die beschriebenen miRNAs möglich. Darunter fallen die miR-15a, miR-19a, miR-22, miR-185 und miR-424. Wie in dieser Arbeit fanden auch Fasseu et al. keine Expressionsunterschiede für die miRNAs miR-15a, miR-19a und miR-424 im Rahmen der Remission. Die miR-22 wies hingegen sowohl im Remissionszustand wie auch bei aktivem Morbus Crohn eine Expressionsveränderung bei Fasseu et al. auf, welcher auch im Gruppenvergleich von nicht aktivem Kolongewebe bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa von Bedeutung blieb. Hinweise für Veränderungen der miR-22 konnten auch in dieser Arbeit bei Morbus Crohn Patienten festgestellt werden, wobei sie ausschließlich im Vergleich von stark entzündetem Gewebe statistische Bedeutung erlangen konnten. Da beide Untersuchungen die selbe Tendenz aufweisen, könnte als Hintergrund eine durch die durchgeführten Qualitätskontrollen bessere Trennschärfe bei Fasseu et al. bestehen. Eine dritte Untersuchung wäre zur endgültigen Bestätigung optimal. Der in dieser Arbeit festgestellte Expressionsunterschied der miR-185 wurde von Fasseu et al. nicht beschrieben. In dessen Arbeit fiel lediglich das Cluster 7# bestehend aus den miRNAs miR-185, **miR-196a**, miR-214, miR-376a, miR-424 (Fettdruck = überexprimiert, unterstrichen = supprimiert) für nicht entzündliches Kolongewebe von Colitis ulcerosa Patienten als verändert auf. Eine Ursache lässt sich hierfür derzeit nicht finden. Da aktuell auch keine weiteren Publikationen zur Expression dieser miRNA im Rahmen einer Colitis ulcerosa existiert, wäre eine weitere Analyse zu ihrem Expressionsverhalten zu empfehlen.

5.2.7.4 Theoretische Abhandlung der gemeinsamen Wirkungsweise der miRNAs miR-18a und miR-185

Zur theoretischen Untersuchung, ob die miRNAs miR-18a und miR-185 eher ein pro- oder antiinflammatorisches System bedienen, wurde eine Datenbankanalyse dieser miRNAs durchgeführt. Es zeigte sich, dass beide miRNAs erneut die typischen Verhältnisse in der Verteilung der miRNAs in Bezug auf die Lokalisation und die Funktion aufwiesen (nicht dargestellt). Die Pathwayanalyse legte nahe,

dass metabolischen Prozessen der Biosynthese (22%), Antwortreaktionen (16%) etwa auf Stress (n = 115) sowie Signalwege (n = 115) beeinflusst werden. Weitere Ziele stellen Regulationspathways (16%) der Transkription (n = 322) sowie der Apoptose (n = 125) dar. Auch Immunsystemreaktionen (8%) wie etwa die Steuerung der T-Zell-Funktionen (n = 54) sowie der Antwortkaskaden auf virale oder bakterielle Stimulation (n = 199), werden durch diese miRNAs gemeinsam reguliert.

Bei Betrachtung der 10 am häufigsten regulierten Proteine fiel auf, dass die regulierten Zielproteine nicht unbekannt sind. Bereits in den zuvor erfolgten Analysen fielen immer wieder Proteine wie die „small proline-rich proteine der Familie 2“ (SPRR2F, keine genauen Informationen bekannt) oder die bereits beschriebene „lymphocyte-specific protein tyrosin kinase“ (LCK) auf. Zusätzlich wird ein Protein beeinflusst (vgl. hierzu auch die durch ClueGO ausgegebene Grafik), welches bereits mehrfach mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in Zusammenhang gebracht werden konnte. Die Rede ist von MICA, einer MHC Class I polypeptide-related Sequence A (312, 313). Bei dem Protein handelt es sich um ein durch Stressreaktionen induziertes Oberflächenprotein, welches von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen im Bereich des Epithels über deren NKG2D-Rezeptor erkannt wird. Die Folge ist die Einleitung der Entzündungsreaktion durch Aktivierung dieser Zellen. Durch Senkung der Expressionslevel von miR-18a und miR-185 könnte es somit zu einer vermehrten Produktion dieses proentzündlichen Proteins kommen und somit die Entzündungsreaktion begünstigt werden. Experimentelle Untersuchungen zum Nachweis einer solchen These stehen jedoch noch aus.

In der Analyse mittels ClueGO fielen außerdem die positive Regulation des T-Zell-Rezeptor Signalweges sowie die MyD88-abhängige positive Regulation des Toll-like Rezeptor Signalweges auf. Beide Signalwege sind bereits unter Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beschrieben worden. Das gerade diese beiden Signalwege erneut hervorgehoben werden, ist aus zwei Gründen nachvollziehbar. Zum einen wurden erneut eine miRNA (miR-185) abgebildet, welche auch im Rahmen des Erkrankungsprozesses eine Rolle spielt, zum anderen werden Signalwege angesprochen, welche sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch agieren können und damit Funktionen im Homöostase-Prozess widerspiegeln.

Wie bereits ausgeführt schilderte Niesner et al. (287) das über die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und somit einer Aktivierung des NFAT- und NF- κ B-Signalweges

eine vermehrte Zytokinproduktion stattfindet. Gleichzeitig wurde jedoch auch gezeigt, dass im Rahmen der mehrfachen Aktivierung eine vermehrte Expression des *twist1* Gen auftrat, welches wiederum kontrollierend auf die Entzündungsreaktion und die Zytokinproduktion durch Hemmung des NF- κ B-Signalweges einwirkte.

5.2.8 miRNA-Expression im Rahmen einer infektiösen Kolitis

In den durchgeführten Analysen ließen sich keinerlei signifikanten Expressionsveränderungen der miRNAs zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit einer infektiösen Darmerkrankung abgrenzen. Ursächlich hierfür kann das kleinere Kollektiv mit 6 Patienten sein. Jedoch lassen die Zahlen als auch die graphischen Auswertungen mittels Boxplot eher auf eine fehlende Beteiligung schließen. Einzig die miR-374b zeigte im Kollektivvergleich eine gesteigerte Expression im Vergleich zu Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa Patienten auf, erreichte aber kein Signifikanzniveau im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Auffällig war sogar, dass im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung die miR-374b in ihrer Expression eher supprimiert zu sein schien. Daraus lässt sich die Vermutung schließen, dass die miR-374b für eine adäquate inflammatorische Immunreaktion verantwortlich ist. Das interessanteste Zielprotein für weitere Untersuchungen stellt NFIL3 (nuclear factor interleukin 3 regulated) dar, da von diesem Protein bereits mehrfach Publikationen in Zusammenhang mit der Sekretion von Immunglobulinen des Typs IgE zur Abwehr von Darmparasiten, sowie von Regulationsprozessen etwa von Typ2 T-Helferzellen oder der IL12p40-Produktion durch Makrophagen der Darmschleimhaut (314) veröffentlicht worden sind.

5.2.9 Zusammenfassung zur Beeinflussung durch die miRNAs

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die miRNAs auf unterschiedliche Weise auf das multifaktorielle Geschehen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Einfluss nehmen können. Besonders die Signalwege NF κ B, MAP-Kinase, STAT und unfolded Protein Response wurden im Rahmen der Datenbankanalysen und der Pathwaydarstellungen als mögliche Targets der identifizierten miRNAs hervorgehoben. Jeglicher diese Signalwege wurden in Bezug auf ihre Bedeutung im Pathogenesegeschehen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen über experimentelle Untersuchungen als relevant identifiziert. Ob die miRNAs nun eine proentzündliche Funktion durch Aktivierung dieser Signalwege über entsprechend regulierte Proteine einnehmen, oder ob sie eher eine inhibitorische und somit antientzündliche Funktion ausüben, muss in Protein- und miRNA-

spezifischen experimentellen Untersuchungen in der Zukunft herausgefunden werden. Durch die Datenbankanalysen wurden zumindest erfolgsversprechende Zielstrukturen und Proteine für diese Untersuchungen herausgefiltert.

5.3 Bedeutung der Beeinflussung von miRNAs als zukünftige pharmakologische Ziele

In dieser Arbeit konnten dargestellt werden, dass sich einzelne miRNAs im Rahmen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung in ihrer Expression unterscheiden. Dieses Vorgehen ist somit kongruent zu dem Vorgehen von experimentellen Arbeiten aus vielen anderen Fachrichtungen, wie etwa zur Idiopathischen Lungenfibrose (315). Durch die vollzogenen Datenbankanalysen konnten Hinweise darauf gesammelt werden, wie diese miRNAs in bereits mehrfach beschriebene, fehlregulierte Signalwege eingreifen und möglicherweise die Ursache für diese Fehlregulation darstellen. Es stellt sich somit die Frage, welche Konsequenzen aus diesen Daten gezogen werden können.

Die Begründung, die miRNA-Expression als therapeutisches Ziel zu beeinflussen, geht zum einen aus der objektivierbaren veränderten Expression im erkrankten Gewebe im Vergleich zum gesunden Gewebe hervor. Auf der anderen Seite konnten aber auch bereits erste Erfolge durch die gezielte Beeinflussung der miRNAs beobachtet werden (vgl. hierzu beispielsweise die Untersuchungen von Lanford et al. zur Hepatitis C-Expression im Schimpansen (239)).

Das besondere Potential dieser Beeinflussung resultiert aus dem „**Unus pro Omnibus**“-Prinzip, wonach eine miRNA mehrere Gene beeinflussen kann, welche unter dem Kontext eines Netzwerkes agieren. Auf diese Weise können durch die Manipulation der miRNAs auf sehr hoher Regulationsebene die zellulären Prozesse in gesunden wie in fehlfunktionierenden Zellen gesteuert werden. Diese Fähigkeit der Regulation unterschiedlichster Gene in einem molekularen Pathway wird besonders durch die Untersuchungen von Li et al. zur Biologie des T-Zell-Rezeptors deutlich (243). Aus dieser Untersuchung ging hervor, dass in dem Regulationsnetzwerk dieses Rezeptors bestehend aus 40 unterschiedlichen Kinasen und Phosphatasen die miR-181a eine bedeutende Rolle in der Regulation der Sensitivität und der Signalstärke dieses Rezeptors einnimmt. Dazu steuert sie auf post-transkriptionaler Ebene mehrere dieser Phosphatasen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Steuerung äußerst effizient durch die alleinige Beeinflussung der miR-181a von statten geht.

Zur Beeinflussung dieser Netzwerke stehen pharmakologisch unterschiedliche Methoden zur Verfügung, welche jedoch alle noch nicht ausgereift sind und verschiedene Vor- und Nachteile aufweisen. Diese Strategien werden in der *Tabelle 36* zusammenfassend dargestellt, welche auf der Grundlage des Reviews von Garzon et al. (316) entstand und modifiziert wurde.

In Zukunft wird das bessere Verständnis des Geneseprozesses und der Funktion der miRNAs dazu beitragen, dass weitere und ausgereifere auf miRNAs basierende Therapien entwickelt werden können. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei jedoch nicht nur auf die post-transkriptionale Beeinflussung einzelner Proteine gelegt werden, sondern gerade auch auf die Vernetzung dieser innerhalb der Funktionsnetzwerke. Dazu wird eine weitere Optimierung der chemischen Struktur, der Transportmechanismen und der Wirkungseffizienz nötig sein. Außerdem werden noch weitere detaillierte pharmakokinetische und pharmakologische Studien zur Abschätzung der Wirkung sowie des klinischen Erfolges benötigt. Auf Grund der bisher zahlreich erzielten motivierenden Ergebnisse besteht jedoch große Hoffnung, dass alle diese Hürden in Zukunft genommen werden, was sich auch darin widerspiegelt, dass zahlreiche Pharmafirmen die Entwicklung miRNA-basierender Therapien gezielt vorantreiben und gleichzeitig an neuen Transportsystemen bestehend aus Polymeren, Nanopartikeln oder Viren arbeiten.

Strategie	Funktion	Hindernisse	(erreichte) Vorteile	Experimentelle Datenlage	Herausforderungen/Untersuchungen
2'-O-methyl-phosphorilierte Oligonukleotide	kompetitive Hemmung von reifen miRNAs	Transport Halbwertszeit zelluläre Aufnahme Nebenwirkungen Limitierte Erfolge	Sicherheit gute Stabilität Nukleasenresistenz Bindungsaffinität	in vitro und in vivo Daten (Tiermodelle) Klinische Studien (Phasen I, II, und III)	Verbesserung des Transports
2'-O-methyl-phosphorilierte Oligonukleotide mit Cholesterolanteil	kompetitive Hemmung von reifen miRNAs	Toxizität hohe Dosen für Wirkung benötigt	Gute Bioverfügbarkeit	in vitro und in vivo Daten (Tiermodelle)	Reduktion der Toxizität
Geschlossene Nukleinsäure-Verbindungen (LNA = locked nucleic acid)	Ribosering über Methylenbrücke geschlossen => verbesserte Affinität bei kompetitiver Hemmung	Nebenwirkungen Toxizität (dosisabhängig)	Sicherheit Verteilung Transport Affinität	in vitro und in vivo Daten (Mäuse, Schimpansen, Menschen)	Gewebespezifischer Transport Pharmakokinetik Pharmakodynamik Toxizität
Liposom-Oligonukleotid-Komplexe	Liposom als Träger für Oligonukleotide	Toxizität (dosisabhängig) Hypersensitivität	Stabilität Transport	in vitro und in vivo Daten (Tiermodelle)	Optimierung der Liposomen-Struktur
Polymer-Nanopartikel-Oligonukleotid-Komplexe	alternativer Träger für Oligonukleotide	Nebenwirkungen Toxizität (dosisabhängig)	Stabilität Transport minimale Toxizität	in vitro und in vivo Daten (Tiermodelle)	Gewebespezifischer Transport
miR-Masken (miR-mask)	Aufbau wie miRNA; Bindet an 3' UTR-Region einer mRNA und inhibiert diese	Transport limitierte Einsetzbarkeit	Genspezifische Effekte kaum Nebenwirkungen	in vitro und in vivo Daten	Verbesserung des Transports in vivo Verbesserung der Aktivität in vivo
miRNA-Schwämme (miRNA sponge)	Konstrukt mit multiplen Bindungsstellen für eine miRNA	Transport Nebenwirkungen	Inhibition ganzer miRNA Familien	in vitro und in vivo Daten	Verbesserung des Transports in vivo Verbesserung der Aktivität in vivo
Adenoviren-assoziierte Vektoren (AAV) kodierend für miRNAs	Beimpfung von Zielzellen mit Vektoren	Toxizität (dosisabhängig) Nebenwirkungen	Sicher gute Transduktion lang anhaltende Expression	in vitro und in vivo Daten Klinische Studien (Phase I, II, III) Erfahrungen von siRNA	Mehr Daten nötig
Inhibitoren von kleinen Molekülen (small-molecule inhibitors)	Modulation der miRNA-Expression über Regulation von Transkriptions-faktoren	zu geringes Wissen	Methode zum Screenen von Small-molecule Inhibitoren aktuell entwickelt	in vitro Daten	weitere experimentelle Daten benötigt
miRNA mimics	synthetisch hergestellte Oligonukleotide, welche einer miRNA entsprechen	sehr kurze Halbwertszeit Transport	Sicher	in vitro Daten	mehr Untersuchungen nötig

Tabelle 36 Übersicht der pharmakologischen Strategien zur Beeinflussung der miRNA-Expression; Tabelle modifiziert nach (316)

6 Zusammenfassung

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen setzen sich hauptsächlich aus den Entitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammen. Beide Erkrankungen konfrontieren unsere heutige Gesellschaft mit hohen Inzidenzraten in der westlichen Welt und zunehmend steigenden Inzidenzraten im asiatischen Raum. Insbesondere Kinder scheinen das neue Ziel dieser chronischen Erkrankungsformen zu werden, welche neben einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität, mit sozialen und wirtschaftlichen Folgen sowie einem erhöhten Risiko für die Entwicklung kolorektaler Karzinome einhergehen. Auf Grund der steigenden Brisanz dieses Themas wird international mit Hochdruck an der Ursachenforschung und der Entwicklung neuer Therapeutika gearbeitet. Obwohl sich bereits große Erfolge erzielen ließen, ist die genaue Pathogenese noch unklar und eine endgültige Heilung noch nicht möglich. Durch die Entdeckung von 22 nt langen, regulierenden RNAs, auch genannt miRNAs, wurde ein neuer Baustein im Verständnis zellulärer Regelprozesse entdeckt, welcher sich allgemeingültig auf alle Lebewesen anwenden lässt. Durch diese besondere Bedeutung in der Regulation von zellulären Regelprozessen und dadurch der Differenzierung und Aktivierung von Antworten etwa des Immunsystems, ist international ein großes Forschungsinteresse bezüglich der Bedeutung von miRNAs im Rahmen von chronisch-entzündliche Darmerkrankungen entstanden. Auch diese Arbeit hat sich mit der Thematik auseinander gesetzt, ob es im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu Veränderungen der Expression von miRNAs kommt. Hierzu wurden über ein miRNA-Array System 12 miRNAs als potentiell relevante Ziele identifiziert und an einem Kollektiv aus insgesamt 131 Patienten und 163 Biopsien aus dem Bereich des Darmes überprüft. Es zeigte sich hierbei, dass im Rahmen eines **Morbus Crohn** mit Befall des **Dickdarms** die miRNAs **let-7d** und **miR-22** in gesteigerter Expression vorlagen. Da im **terminalen Ileum** eine gesonderte Immunsituation vorliegt wurde dieser Bereich zusätzlich bei der Erkrankung Morbus Crohn untersucht. Es zeigten sich Expressionsveränderungen für die **miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424**. Bei Patienten mit einer **Colitis ulcerosa** waren die miRNAs **let-7d, miR-185** und **miR-424** in ihrem Expressionsverhalten verändert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit vom Entzündungsgrad bei bestehender Colitis ulcerosa eine zunehmenden Überexpression der miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 erfolgte. Die miRNAs **miR-18a** und **miR-185** wiesen unter **Remissions-**

bedingungen Expressionsveränderungen auf und lassen somit den Verdacht eines protektiven Effektes aufkommen. Mit Hilfe von computerbasierten Datenbanken konnte gemeinsam regulierenden miRNAs Proteine und Pathways zugeordnet werden, welche einen Zusammenhang mit bereits pathogenetisch bestätigten Signalwegen wie etwa dem $\text{nF-}\kappa\text{B}$ und MAPK-Signalweg nahelegen. Auch konnte herausgearbeitet werden, dass einige, der von diesen miRNAs regulierten Proteine, bereits in veröffentlichten Arbeiten als fehlreguliert festgestellt wurden, jedoch blieb die Ursache dieser Fehlregulation gänzlich unbekannt. Mit den in dieser Arbeit erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass eine Kongruenz der Befunde vorliegt, welche einen Zusammenhang der miRNA-Expression mit der Fehlregulation bestimmter Proteine nicht nur nahelegt, sondern darüber hinaus auch noch einige weitere potentielle Proteinziele für weitere Untersuchungen aufführt. Auf diese Weise liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Informationen, welche die Erforschung der pathogenetischen Vorgänge unterstützen kann. Dazu ist es jedoch notwendig, die Relevanz der hier entdeckten, computerbasierten Proteine in zukünftigen Untersuchungen einer genauen Prüfung zu unterziehen. Letztlich stellen miRNAs somit nicht nur eine weitere Möglichkeit dar, die Pathogenese-Prozesse von einem anderen Blickwinkel aus zu untersuchen, sondern sie wecken auch die Hoffnung, durch zukünftige gezielte therapeutische Beeinflussung, eine neue Stellschraube in der Therapie dieser Erkrankung zu sein. Am Ende steht somit die Hoffnung mehr Patienten die Teilnahme an einem schmerzfreien und sozial eingebundenen Leben zu gewährleisten.

7 Literaturverzeichnis

1. Talley NJ, Abreu MT, Achkar JP, Bernstein CN, Dubinsky MC, Hanauer SB, et al. An evidence-based systematic review on medical therapies for inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106 Suppl 1:S2-25; quiz S6. Epub 2011/04/16.
2. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1504-17.
3. Ooi CJ, Fock KM, Makharia GK, Goh KL, Ling KL, Hilmi I, et al. The Asia-Pacific consensus on ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25(3):453-68. Epub 2010/04/08.
4. Prenzler A, Mittendorf T, Conrad S, von der Schulenburg JM, Bokemeyer B. [Costs of Crohn's disease in Germany from the perspective of the Statutory Health Insurance]. *Z Gastroenterol*. 2009;47(7):659-66. Epub 2009/07/17. Die direkten Kosten der Versorgung von Patienten mit Morbus Crohn aus der Perspektive der Gesetzlichen Krankenversicherung.
5. Prenzler A, Bokemeyer B, Mittendorf T, von der Schulenburg JM. [Costs of ulcerative colitis within the German Statutory Health Insurance]. *Dtsch Med Wochenschr*. 135(7):281-6. Epub 2010/02/11. Kosten der Colitis ulcerosa--eine Kalkulation aus der Perspektive der Gesetzlichen Krankenversicherung.
6. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol*. 2001;7(2):175-84. Epub 2002/01/31.
7. Dalziel TK. Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis. *Dis Colon Rectum*. 1989;32(12):1076-8. Epub 1989/12/01.
8. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis; a pathologic and clinical entity. *Am J Med*. 1952;13(5):583-90. Epub 1952/11/01.
9. Siegmund B ZM. Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen. In: Dietel M SN, Zeitz M, editor. *Harrisons Innere Medizin*. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2005.
10. Ekbohm A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10 Suppl 1:S32-4. Epub 2004/06/01.
11. Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Scholmerich J, et al. The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20(9):917-23. Epub 2008/09/17.
12. Jacobsen BA, Fallingborg J, Rasmussen HH, Nielsen KR, Drewes AM, Puhos E, et al. Increase in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in northern Denmark: a population-based study, 1978-2002. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18(6):601-6. Epub 2006/05/17.
13. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996;39(5):690-7.
14. Hildebrand H, Finkel Y, Grahnquist L, Lindholm J, Ekbohm A, Askling J. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. *Gut*. 2003;52(10):1432-4. Epub 2003/09/13.

15. Freeman HJ. Comparison of longstanding pediatric-onset and adult-onset Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;39(2):183-6. Epub 2004/07/23.
16. Timmer A, Behrens R, Buderus S, Findeisen A, Hauer A, Keller KM, et al. Childhood onset inflammatory bowel disease: predictors of delayed diagnosis from the CEDATA German-language pediatric inflammatory bowel disease registry. *J Pediatr.* 2011;158(3):467-73 e2. Epub 2010/11/06.
17. Wolters FL, Russel MG, Sijbrandij J, Schouten LJ, Odes S, Riis L, et al. Crohn's disease: increased mortality 10 years after diagnosis in a Europe-wide population based cohort. *Gut.* 2006;55(4):510-8. Epub 2005/09/10.
18. Canavan C, Abrams KR, Mayberry J. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(8):1097-104. Epub 2006/04/14.
19. Autenrieth DM, Baumgart DC. Toxic megacolon. *Inflamm Bowel Dis.* 2011. Epub 2011/10/20.
20. Louis E. Epidemiology of the transition from early to late Crohn's disease. *Dig Dis.* 2012;30(4):376-9. Epub 2012/07/17.
21. Canavan C, Abrams KR, Mayberry JF. Meta-analysis: mortality in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25(8):861-70. Epub 2007/04/04.
22. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology.* 2010;28:573-621. Epub 2010/03/03.
23. Laukoetter MG, Nava P, Nusrat A. Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008;14(3):401-7. Epub 2008/01/18.
24. Van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J. The genetics of Crohn's disease. *Annual review of genomics and human genetics.* 2009;10:89-116. Epub 2009/05/21.
25. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006;12(23):3668-72. Epub 2006/06/15.
26. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001;411(6837):599-603. Epub 2001/06/01.
27. Stanford SM, Krishnamurthy D, Falk MD, Messina R, Debnath B, Li S, et al. Discovery of a novel series of inhibitors of lymphoid tyrosine phosphatase with activity in human T cells. *J Med Chem.* 2011;54(6):1640-54. Epub 2011/02/24.
28. Diaz-Gallo LM, Espino-Paisan L, Fransen K, Gomez-Garcia M, van Sommeren S, Cardena C, et al. Differential association of two PTPN22 coding variants with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(11):2287-94. Epub 2011/02/03.
29. Long SA, Cerosaletti K, Wan JY, Ho JC, Tatum M, Wei S, et al. An autoimmune-associated variant in PTPN22 reveals an impairment of IL-2R signaling in CD4(+) T cells. *Genes Immun.* 2011;12(2):116-25. Epub 2010/12/24.
30. Chu Y, Vahl JC, Kumar D, Heger K, Bertossi A, Wojtowicz E, et al. B cells lacking the tumor suppressor TNFAIP3/A20 display impaired differentiation and hyperactivation and cause inflammation and autoimmunity in aged mice. *Blood.* 2011;117(7):2227-36. Epub 2010/11/23.
31. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in

- inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet.* 1999;64(3):808-16. Epub 1999/03/03.
32. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics.* 2007;39(2):207-11. Epub 2007/01/04.
33. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics.* 2007;39(7):830-2. Epub 2007/06/08.
34. Paavola P, Helio T, Kiuru M, Halme L, Turunen U, Terwilliger J, et al. Genetic analysis in Finnish families with inflammatory bowel disease supports linkage to chromosome 3p21. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(5):328-34. Epub 2001/05/30.
35. Dideberg V, Kristjansdottir G, Milani L, Libioulle C, Sigurdsson S, Louis E, et al. An insertion-deletion polymorphism in the interferon regulatory Factor 5 (IRF5) gene confers risk of inflammatory bowel diseases. *Hum Mol Genet.* 2007;16(24):3008-16. Epub 2007/09/21.
36. Fowler EV, Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, et al. TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. *Journal of medical genetics.* 2005;42(6):523-8. Epub 2005/06/07.
37. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, et al. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1863-70. Epub 2000/04/25.
38. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, Sandor C, Farnir F, Franchimont D, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet.* 2007;3(4):e58. Epub 2007/04/24.
39. Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut.* 2009;58(8):1152-67. Epub 2009/07/14.
40. Uthoff SM, Crawford NP, Eichenberger MR, Hamilton CJ, Petras RE, Martin ER, et al. Association of ulcerative colitis with the inflammatory bowel disease susceptibility locus IBD2 in non-Jewish Caucasians and evidence of genetic heterogeneity among racial and ethnic populations with Crohn disease. *American journal of medical genetics.* 2002;113(3):242-9. Epub 2002/11/20.
41. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet.* 2000;66(6):1857-62. Epub 2000/04/05.
42. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(13):7502-7. Epub 1998/06/24.
43. Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, Croucher PJ, Cuthbert A, Mascheretti S, et al. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):321-6. Epub 2001/12/26.

44. Blumberg RS. Immune Mechanisms in Inflammatory Bowel Disease: Springer; 2006 02.05.2006. 248 p.
45. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology*. 2003;125(1):47-57. Epub 2003/07/10.
46. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seeger D, et al. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2003;124(4):1001-9. Epub 2003/04/03.
47. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, et al. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut*. 2004;53(11):1658-64. Epub 2004/10/14.
48. Van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Ho GT, Arnott ID, Wilson DC, et al. Genetics of the innate immune response in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(3):338-55. Epub 2007/01/09.
49. Pierik M, Joossens S, Van Steen K, Van Schuerbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, et al. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(1):1-8. Epub 2005/12/24.
50. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-75. Epub 2008/02/29.
51. Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(10):767-77. Epub 2007/09/04.
52. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 2008;456(7219):259-63. Epub 2008/10/14.
53. Holtta V, Klemetti P, Sipponen T, Westerholm-Ormio M, Kociubinski G, Salo H, et al. IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2008;14(9):1175-84. Epub 2008/05/31.
54. Lee JW, Wang P, Kattah MG, Youssef S, Steinman L, DeFea K, et al. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol*. 2008;181(9):6536-45. Epub 2008/10/23.
55. Salazar-Gonzalez RM, Niess JH, Zammit DJ, Ravindran R, Srinivasan A, Maxwell JR, et al. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity*. 2006;24(5):623-32. Epub 2006/05/23.
56. Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S. Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics*. 2007;120(2):354-61. Epub 2007/08/03.
57. Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, et al. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(9):2016-25. Epub 2007/07/10.
58. Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, et al. Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1998;10(3):243-9. Epub 1998/05/19.

59. Baron S, Turck D, Leplat C, Merle V, Gower-Rousseau C, Marti R, et al. Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut*. 2005;54(3):357-63. Epub 2005/02/16.
60. Sonntag B, Stolze B, Heinecke A, Luegering A, Heidemann J, Lebedz P, et al. Preterm birth but not mode of delivery is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease later in life. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(11):1385-90. Epub 2007/06/15.
61. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World J Gastroenterol*. 2008;14(2):165-73. Epub 2008/01/12.
62. Bernstein CN, Rawsthorne P, Blanchard JF. Population-based case-control study of measles, mumps, and rubella and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(6):759-62. Epub 2007/01/19.
63. Mendoza JL, Lana R, Diaz-Rubio M. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and its relationship with Crohn's disease. *World J Gastroenterol*. 2009;15(4):417-22. Epub 2009/01/20.
64. Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M. The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut*. 2007;56(10):1387-92. Epub 2007/05/12.
65. Aldhous MC, Drummond HE, Anderson N, Smith LA, Arnott ID, Satsangi J. Does cigarette smoking influence the phenotype of Crohn's disease? Analysis using the Montreal classification. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(3):577-88. Epub 2007/03/07.
66. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut*. 1995;37(5):668-73.
67. Cucino C, Sonnenberg A. Occupational mortality from inflammatory bowel disease in the United States 1991-1996. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(4):1101-5. Epub 2001/04/24.
68. Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P. Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol*. 2001;154(4):328-35. Epub 2001/08/10.
69. Mikocka-Walus AA, Turnbull DA, Moulding NT, Wilson IG, Andrews JM, Holtmann GJ. Controversies surrounding the comorbidity of depression and anxiety in inflammatory bowel disease patients: a literature review. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(2):225-34. Epub 2007/01/09.
70. Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2001;36(1):2-15. Epub 2001/02/24.
71. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):59-65. Epub 2010/03/06.
72. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134(2):577-94. Epub 2008/02/05.
73. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis*. 2007;44(2):256-62. Epub 2006/12/19.
74. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(34):13780-5. Epub 2007/08/19.
75. Rosenfeld G, Bressler B. Mycobacterium avium paratuberculosis and the etiology of Crohn's disease: a review of the controversy from the clinician's perspective. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 2010;24(10):619-24. Epub 2010/11/03.
 76. Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, Fedorak RN, Tannock GW. The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn's disease and ulcerative colitis patients. *Journal of medical microbiology*. 2006;55(Pt 8):1141-9. Epub 2006/07/20.
 77. Marchesi JR, Holmes E, Khan F, Kochhar S, Scanlan P, Shanahan F, et al. Rapid and noninvasive metabonomic characterization of inflammatory bowel disease. *J Proteome Res*. 2007;6(2):546-51. Epub 2007/02/03.
 78. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Herber A. Mucosal flora in Crohn's disease and ulcerative colitis - an overview. *J Physiol Pharmacol*. 2009;60 Suppl 6:61-71. Epub 2010/03/27.
 79. Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF. Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1995;108(5):1396-404. Epub 1995/05/01.
 80. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, et al. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1405-13. Epub 1998/12/03.
 81. D'Haens GR, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology*. 1998;114(2):262-7. Epub 1998/02/07.
 82. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology*. 2004;126(6):1620-33. Epub 2004/05/29.
 83. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature clinical practice Gastroenterology & hepatology*. 2006;3(7):390-407. Epub 2006/07/05.
 84. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. 1993;75(2):263-74. Epub 1993/10/22.
 85. Nenci A, Becker C, Wullaert A, Gareus R, van Loo G, Danese S, et al. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*. 2007;446(7135):557-61. Epub 2007/03/16.
 86. Kobayashi KS, Chamillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*. 2005;307(5710):731-4. Epub 2005/02/05.
 87. Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*. 1996;274(5285):262-5. Epub 1996/10/11.
 88. Swidsinski A, Sydora BC, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Vaneechoutte M, Lupicki M, et al. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(8):963-70. Epub 2007/04/25.

89. Trabucchi E, Mukenge S, Baratti C, Colombo R, Fregoni F, Montorsi W. Differential diagnosis of Crohn's disease of the colon from ulcerative colitis: ultrastructure study with the scanning electron microscope. *International journal of tissue reactions*. 1986;8(1):79-84. Epub 1986/01/01.
90. Hermiston ML, Gordon JI. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *The Journal of cell biology*. 1995;129(2):489-506. Epub 1995/04/01.
91. Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, et al. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*. 2003;171(11):6164-72. Epub 2003/11/25.
92. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2004;84(3):282-91. Epub 2004/02/10.
93. Dahan S, Roth-Walter F, Arnaboldi P, Agarwal S, Mayer L. Epithelia: lymphocyte interactions in the gut. *Immunol Rev*. 2007;215:243-53. Epub 2007/02/13.
94. Shao L, Kamalu O, Mayer L. Non-classical MHC class I molecules on intestinal epithelial cells: mediators of mucosal crosstalk. *Immunol Rev*. 2005;206:160-76. Epub 2005/07/29.
95. Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol*. 2005;174(9):5814-22. Epub 2005/04/22.
96. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? *Dig Dis*. 2010;28(3):395-405. Epub 2010/10/12.
97. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(7):519-29. Epub 2007/06/15.
98. Schroder M. The unfolded protein response. *Molecular biotechnology*. 2006;34(2):279-90. Epub 2006/12/19.
99. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev*. 2005;206:149-59. Epub 2005/07/29.
100. Selby WS, Poulter LW, Hobbs S, Jewell DP, Janossy G. Heterogeneity of HLA-DR-positive histiocytes in human intestinal lamina propria: a combined histochemical and immunohistological analysis. *Journal of clinical pathology*. 1983;36(4):379-84. Epub 1983/04/01.
101. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1997;112(5):1493-505. Epub 1997/05/01.
102. Rugtveit J, Brandtzaeg P, Halstensen TS, Fausa O, Scott H. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut*. 1994;35(5):669-74. Epub 1994/05/01.
103. Kamada N, Hisamatsu T, Okamoto S, Chinen H, Kobayashi T, Sato T, et al. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(6):2269-80. Epub 2008/05/24.

104. Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(9):2441-50. Epub 2009/09/05.
105. Scott MG, Nahm MH, Macke K, Nash GS, Bertovich MJ, MacDermott RP. Spontaneous secretion of IgG subclasses by intestinal mononuclear cells: differences between ulcerative colitis, Crohn's disease, and controls. *Clinical and experimental immunology*. 1986;66(1):209-15. Epub 1986/10/01.
106. Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut*. 2002;50 Suppl 3:III60-4. Epub 2002/04/16.
107. Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, et al. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology*. 1997;112(4):1169-78. Epub 1997/04/01.
108. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, et al. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(1):65-70. Epub 2002/12/13.
109. Monteleone G, Monteleone I, Fina D, Vavassori P, Del Vecchio Blanco G, Caruso R, et al. Interleukin-21 enhances T-helper cell type 1 signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2005;128(3):687-94. Epub 2005/03/15.
110. Lochner M, Ohnmacht C, Presley L, Bruhns P, Si-Tahar M, Sawa S, et al. Microbiota-induced tertiary lymphoid tissues aggravate inflammatory disease in the absence of RORgamma t and LTi cells. *J Exp Med*. 2011;208(1):125-34. Epub 2010/12/22.
111. Herrlinger KR, Dittmann R, Weitz G, Wehkamp J, Ludwig D, Schwab M, et al. Serum procalcitonin differentiates inflammatory bowel disease and self-limited colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10(3):229-33. Epub 2004/08/05.
112. Gisbert JP, Bermejo F, Perez-Calle JL, Taxonera C, Vera I, McNicholl AG, et al. Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15(8):1190-8. Epub 2009/03/18.
113. Foell D, Kucharzik T, Kraft M, Vogl T, Sorg C, Domschke W, et al. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut*. 2003;52(6):847-53. Epub 2003/05/13.
114. Sipponen T, Nuutinen H, Turunen U, Farkkila M. Endoscopic evaluation of Crohn's disease activity: comparison of the CDEIS and the SES-CD. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(12):2131-6. Epub 2010/09/18.
115. Otley A, Steinhart AH. Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005(4):CD000296. Epub 2005/10/20.
116. Benchimol EI, Seow CH, Steinhart AH, Griffiths AM. Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(2):CD006792. Epub 2008/04/22.
117. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Hauser W, Herrlinger K, et al. [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol*. 2008;46(9):1094-146. Epub 2008/09/24. S3-Leitlinie "Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn".

118. Steinhart AH, Ewe K, Griffiths AM, Modigliani R, Thomsen OO. Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003(4):CD000301. Epub 2003/10/30.
119. Lémann M, Mary J-Y, Colombel J-F, Duclos B, Soule J-C, Lerebours E, et al. A Randomized, Double-Blind, Controlled Withdrawal Trial in Crohn's Disease Patients in Long-term Remission on Azathioprine. *Gastroenterology.* 2005;128(7):1812-8.
120. Boas I. Ueber einen Fall von operativ geheilter Colitis Ulcerosa. *Dtsch Med Wochenschr.* 1903;29:196.
121. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet.* 2007;369(9573):1641-57.
122. Loftus CG, Loftus EV, Jr., Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, 3rd, et al. Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(3):254-61. Epub 2007/01/09.
123. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001;48(4):526-35. Epub 2001/03/15.
124. Ordas I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *Lancet.* 2012. Epub 2012/08/24.
125. Hoie O, Schouten LJ, Wolters FL, Solberg IC, Riis L, Mouzas IA, et al. Ulcerative colitis: no rise in mortality in a European-wide population based cohort 10 years after diagnosis. *Gut.* 2007;56(4):497-503. Epub 2006/10/10.
126. Roda G. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology.* 2010;16(34):4264.
127. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17(3):831-48. Epub 2011/02/15.
128. Marangoni F, Trifari S, Scaramuzza S, Panaroni C, Martino S, Notarangelo LD, et al. WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells. *J Exp Med.* 2007;204(2):369-80. Epub 2007/02/14.
129. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *Journal of lipid research.* 2009;50 Suppl:S237-42. Epub 2008/11/18.
130. McGovern DP, Gardet A, Torkvist L, Goyette P, Essers J, Taylor KD, et al. Genome-wide association identifies multiple ulcerative colitis susceptibility loci. *Nature genetics.* 2010;42(4):332-7. Epub 2010/03/17.
131. Sun SC. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):501-11. Epub 2008/06/07.
132. Roussomoustakaki M, Satsangi J, Welsh K, Louis E, Fanning G, Targan S, et al. Genetic markers may predict disease behavior in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology.* 1997;112(6):1845-53. Epub 1997/06/01.
133. Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition.* 2004;80(5):1342-52. Epub 2004/11/09.
134. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(1):171-6. Epub 2000/01/19.

135. Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andreoli A, et al. Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case-control study. Cooperative Investigators of the Italian Group for the Study of the Colon and the Rectum (GISC). *Int J Epidemiol.* 1998;27(3):397-404. Epub 1998/08/11.
136. Aldhous MC, Drummond HE, Anderson N, Baneshi MR, Smith LA, Arnott ID, et al. Smoking habit and load influence age at diagnosis and disease extent in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(3):589-97. Epub 2007/03/07.
137. Cosnes J. Smoking, physical activity, nutrition and lifestyle: environmental factors and their impact on IBD. *Dig Dis.* 2010;28(3):411-7. Epub 2010/10/12.
138. Png CW, Linden SK, Gilshenan KS, Zoetendal EG, McSweeney CS, Sly LI, et al. Mucolytic bacteria with increased prevalence in IBD mucosa augment in vitro utilization of mucin by other bacteria. *Am J Gastroenterol.* 2010;105(11):2420-8. Epub 2010/07/22.
139. Nishikawa J, Kudo T, Sakata S, Benno Y, Sugiyama T. Diversity of mucosa-associated microbiota in active and inactive ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 2009;44(2):180-6. Epub 2008/10/01.
140. Andoh A, Sakata S, Koizumi Y, Mitsuyama K, Fujiyama Y, Benno Y. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the diversity of fecal microbiota in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(8):955-62. Epub 2007/04/25.
141. Braun A, Treede I, Gotthardt D, Tietje A, Zahn A, Ruhwald R, et al. Alterations of phospholipid concentration and species composition of the intestinal mucus barrier in ulcerative colitis: a clue to pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(11):1705-20. Epub 2009/06/09.
142. Kruis W, Frick P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut.* 2004;53(11):1617-23. Epub 2004/10/14.
143. Chan I, Liu L, Hamada T, Sethuraman G, McGrath JA. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Experimental dermatology.* 2007;16(11):881-90. Epub 2007/10/12.
144. Matsuda A, Suzuki Y, Honda G, Muramatsu S, Matsuzaki O, Nagano Y, et al. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene.* 2003;22(21):3307-18. Epub 2003/05/23.
145. Wang L, Yu J, Ni J, Xu XM, Wang J, Ning H, et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) is over-expressed in malignant epithelial tumors. *Cancer letters.* 2003;200(1):57-67. Epub 2003/10/11.
146. Hemminki K, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Cancer risks in ulcerative colitis patients. *Int J Cancer.* 2008;123(6):1417-21. Epub 2008/06/19.
147. McGovern DP, Taylor KD, Landers C, Derkowski C, Dutridge D, Dubinsky M, et al. MAGI2 genetic variation and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(1):75-83. Epub 2008/08/23.
148. Wu S, Rhee KJ, Zhang M, Franco A, Sears CL. *Bacteroides fragilis* toxin stimulates intestinal epithelial cell shedding and gamma-secretase-dependent E-cadherin cleavage. *Journal of cell science.* 2007;120(Pt 11):1944-52. Epub 2007/05/17.

149. Frank CF, Hostetter MK. Cleavage of E-cadherin: a mechanism for disruption of the intestinal epithelial barrier by *Candida albicans*. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2007;149(4):211-22. Epub 2007/03/27.
150. Chen WS, Manova K, Weinstein DC, Duncan SA, Plump AS, Prezioso VR, et al. Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev*. 1994;8(20):2466-77. Epub 1994/10/15.
151. Cattin AL, Le Beyec J, Barreau F, Saint-Just S, Houllier A, Gonzalez FJ, et al. Hepatocyte nuclear factor 4alpha, a key factor for homeostasis, cell architecture, and barrier function of the adult intestinal epithelium. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(23):6294-308. Epub 2009/10/07.
152. Teller IC, Beaulieu JF. Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert reviews in molecular medicine*. 2001;3(24):1-18. Epub 2003/10/31.
153. Francoeur C, Escaffit F, Vachon PH, Beaulieu JF. Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IFN-gamma alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(3):G592-8. Epub 2004/04/17.
154. Koutroubakis IE, Petinaki E, Dimoulios P, Vardas E, Roussomoustakaki M, Maniatis AN, et al. Serum laminin and collagen IV in inflammatory bowel disease. *Journal of clinical pathology*. 2003;56(11):817-20. Epub 2003/11/06.
155. Schmehl K, Florian S, Jacobasch G, Salomon A, Korber J. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *International journal of colorectal disease*. 2000;15(1):39-48. Epub 2000/04/15.
156. Wehkamp J, Schmid M, Stange EF. Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2007;23(4):370-8. Epub 2007/06/05.
157. Strugala V, Dettmar PW, Pearson JP. Thickness and continuity of the adherent colonic mucus barrier in active and quiescent ulcerative colitis and Crohn's disease. *International journal of clinical practice*. 2008;62(5):762-9. Epub 2008/01/16.
158. Gersemann M, Becker S, Kubler I, Koslowski M, Wang G, Herrlinger KR, et al. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation; research in biological diversity*. 2009;77(1):84-94. Epub 2009/03/14.
159. Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A. Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1995;108(5):1434-44. Epub 1995/05/01.
160. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170(6):2081-95. Epub 1989/12/01.
161. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infection and immunity*. 1998;66(11):5224-31. Epub 1998/10/24.
162. Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T

- cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006;177(9):5852-60. Epub 2006/10/24.
163. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schaffer AA, Noyan F, et al. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2033-45. Epub 2009/11/06.
164. Steidler L. Treatment of Murine Colitis by *Lactococcus lactis* Secreting Interleukin-10. *Science.* 2000;289(5483):1352-5.
165. Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, et al. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation.* 2004;113(10):1490-7. Epub 2004/05/18.
166. Fichtner-Feigl S, Strober W, Geissler EK, Schlitt HJ. Cytokines mediating the induction of chronic colitis and colitis-associated fibrosis. *Mucosal immunology.* 2008;1 Suppl 1:S24-7. Epub 2008/12/23.
167. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nature medicine.* 2006;12(1):99-106. Epub 2005/12/06.
168. Rao SS, Holdsworth CD, Read NW. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. *Gut.* 1988;29(3):342-5. Epub 1988/03/01.
169. Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;32(2):171-7. Epub 2001/04/26.
170. Kane S. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. *The American Journal of Gastroenterology.* 2003;98(6):1309-14.
171. Carroccio A, Iacono G, Cottone M, Di Prima L, Cartabellotta F, Cavataio F, et al. Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: a prospective study in adults and children. *Clinical chemistry.* 2003;49(6 Pt 1):861-7. Epub 2003/05/27.
172. Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, Sendid B, Poulain D, Peeters M, et al. The value of serologic markers in indeterminate colitis: A prospective follow-up study. *Gastroenterology.* 2002;122(5):1242-7.
173. Floren CH, Benoni C, Willen R. Histologic and colonoscopic assessment of disease extension in ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology.* 1987;22(4):459-62. Epub 1987/05/01.
174. Ford AC, Achkar JP, Khan KJ, Kane SV, Talley NJ, Marshall JK, et al. Efficacy of 5-aminosalicylates in ulcerative colitis: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(4):601-16. Epub 2011/03/17.
175. Ford AC, Bernstein CN, Khan KJ, Abreu MT, Marshall JK, Talley NJ, et al. Glucocorticosteroid therapy in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(4):590-9; quiz 600. Epub 2011/03/17.
176. Khan KJ, Dubinsky MC, Ford AC, Ullman TA, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(4):630-42. Epub 2011/03/17.
177. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, Hanauer SB, Talley NJ, Moayyedi P. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic

- review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(4):644-59, quiz 60. Epub 2011/03/17.
178. Adam B, Liebrechts T, Holtmann G. [Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia Coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine]. *Z Gastroenterol.* 2006;44(3):267-9. Epub 2006/03/04. Die Erhaltungstherapie einer Remission bei einer Colitis ulcerosa ist mit dem Probiotikum *Escherichia coli* Nissle 1917 genauso effektiv wie der Goldstandard Mesalazin.
179. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology.* 2005;128(4):825-32. Epub 2005/04/13.
180. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003;9(3):277-9. Epub 2003/02/20.
181. Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature.* 2007;447(7146):823-8. Epub 2007/05/18.
182. Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Saguer M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 2007;129(6):1141-51. Epub 2007/05/26.
183. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 2006;21(4):533-42. Epub 2006/02/18.
184. Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(12):1108-14. Epub 2006/11/28.
185. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* 2006;20(14):1885-98. Epub 2006/07/04.
186. Parker R, Song H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(2):121-7. Epub 2004/01/30.
187. Warburton D, El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, et al. Lung organogenesis. *Current topics in developmental biology.* 2010;90:73-158. Epub 2010/08/10.
188. Tiscornia G, Izpisua Belmonte JC. MicroRNAs in embryonic stem cell function and fate. *Genes Dev.* 2010;24(24):2732-41. Epub 2010/12/17.
189. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54. Epub 1993/12/03.
190. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855-62. Epub 1993/12/03.
191. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901-6. Epub 2000/03/08.
192. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294(5543):853-8. Epub 2001/10/27.
193. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. *Cell.* 2004;116(2 Suppl):S89-92, 1 p following S6. Epub 2004/04/02.

194. Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*. 2005;309(5740):1567-9. Epub 2005/09/06.
195. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437(7057):376-80. Epub 2005/08/02.
196. Nam JW, Shin KR, Han J, Lee Y, Kim VN, Zhang BT. Human microRNA prediction through a probabilistic co-learning model of sequence and structure. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(11):3570-81. Epub 2005/07/01.
197. Li SC, Pan CY, Lin WC. Bioinformatic discovery of microRNA precursors from human ESTs and introns. *BMC Genomics*. 2006;7:164. Epub 2006/07/04.
198. Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes & Development*. 1998;12(23):3715-27.
199. Cox DN, Chao A, Lin H. piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development*. 2000;127(3):503-14. Epub 2000/01/13.
200. Kim VN. Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. *Genes Dev*. 2006;20(15):1993-7. Epub 2006/08/03.
201. Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science*. 2006;313(5785):320-4. Epub 2006/07/01.
202. Megosh HB, Cox DN, Campbell C, Lin H. The role of PIWI and the miRNA machinery in *Drosophila* germline determination. *Curr Biol*. 2006;16(19):1884-94. Epub 2006/09/05.
203. Forstemann K. Transposon defense in *Drosophila* somatic cells: a model for distinction of self and non-self in the genome. *RNA Biol*. 2010;7(2):158-61. Epub 2010/02/09.
204. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002;21(17):4663-70. Epub 2002/08/29.
205. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-66. Epub 2004/11/05.
206. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097-101. Epub 2006/11/14.
207. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:199-227. Epub 2008/09/27.
208. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9. Epub 2003/09/26.
209. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5. Epub 2004/11/09.
210. Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its *D. melanogaster* homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol*. 2004;14(23):2162-7. Epub 2004/12/14.
211. Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J*. 2007;26(3):775-83. Epub 2007/01/27.

212. Dye MJ, Gromak N, Proudfoot NJ. Exon tethering in transcription by RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2006;21(6):849-59. Epub 2006/03/18.
213. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):83-6. Epub 2007/06/26.
214. Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*. 2007;28(2):328-36. Epub 2007/10/30.
215. Kim VN. MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in Cell Biology*. 2004;14(4):156-9.
216. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 2004;10(2):185-91. Epub 2004/01/20.
217. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(5):376-85. Epub 2005/04/27.
218. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004;431(7006):343-9. Epub 2004/09/17.
219. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 2005;436(7051):740-4. Epub 2005/06/24.
220. Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*. 2006;25(3):522-32. Epub 2006/01/21.
221. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631-40. Epub 2005/11/08.
222. Robb GB, Rana TM. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*. 2007;26(4):523-37. Epub 2007/05/29.
223. Hwang HW, Wentzel EA, Mendell JT. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science*. 2007;315(5808):97-100. Epub 2007/01/06.
224. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208. Epub 2003/10/22.
225. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004;18(5):504-11. Epub 2004/03/12.
226. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20. Epub 2005/01/18.
227. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem*. 2010;79:351-79. Epub 2010/06/11.
228. Chekulaeva M, Filipowicz W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21(3):452-60. Epub 2009/05/20.
229. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999;216(2):671-80. Epub 2000/01/22.
230. Maroney PA, Yu Y, Fisher J, Nilsen TW. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1102-7. Epub 2006/11/28.

231. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):9-22. Epub 2006/12/22.
232. Kedersha N, Anderson P. Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.* 2007;431:61-81. Epub 2007/10/10.
233. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol.* 2009;11(9):1143-9. Epub 2009/08/18.
234. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007;318(5858):1931-4. Epub 2007/12/01.
235. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 2008;30(4):460-71. Epub 2008/05/24.
236. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol.* 2011;223(2):102-15. Epub 2010/12/03.
237. Villanueva RA, Jangra RK, Yi M, Pyles R, Bourne N, Lemon SM. miR-122 does not modulate the elongation phase of hepatitis C virus RNA synthesis in isolated replicase complexes. *Antiviral Res.* 2010;88(1):119-23. Epub 2010/07/20.
238. Jangra RK, Yi M, Lemon SM. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol.* 2010;84(13):6615-25. Epub 2010/04/30.
239. Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, et al. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science.* 2010;327(5962):198-201. Epub 2009/12/08.
240. O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):111-22. Epub 2010/01/26.
241. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):514-20. Epub 2009/06/16.
242. Yu D, Tan AH, Hu X, Athanasopoulos V, Simpson N, Silva DG, et al. Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA. *Nature.* 2007;450(7167):299-303. Epub 2008/01/04.
243. Li QJ, Chau J, Ebert PJ, Sylvester G, Min H, Liu G, et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell.* 2007;129(1):147-61. Epub 2007/03/27.
244. Liston A, Lu LF, O'Carroll D, Tarakhovskiy A, Rudensky AY. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *J Exp Med.* 2008;205(9):1993-2004. Epub 2008/08/30.
245. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009;60(4):1065-75. Epub 2009/04/01.
246. Jeker LT, Bluestone JA. Small RNA regulators of T cell-mediated autoimmunity. *J Clin Immunol.* 2010;30(3):347-57. Epub 2010/04/16.
247. Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S. MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: Crucial regulators in immune response. *Autoimmun Rev.* 2010. Epub 2010/07/16.

248. Hemida MG, Ye X, Thair S, Yang D. Exploiting the Therapeutic Potential of MicroRNAs in Viral Diseases: Expectations and Limitations. *Mol Diagn Ther.* 2010;14(5):271-82. Epub 2010/11/09.
249. Wang S, Zhang Z. Maggot microRNA: A new inhibitory pathway to bacterial infection. *Med Hypotheses.* 2011;76(2):254-5. Epub 2010/11/03.
250. Tsai LM, Yu D. MicroRNAs in common diseases and potential therapeutic applications. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010;37(1):102-7. Epub 2009/08/13.
251. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research.* 2003;13(11):2498-504. Epub 2003/11/05.
252. Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, et al. Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(10):1729-38. Epub 2010/09/18.
253. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002;420(6915):520-62. Epub 2002/12/06.
254. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Animal models of IBD: linkage to human disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2010;10(5):578-87. Epub 2010/09/24.
255. Eckmann L. Animal models of inflammatory bowel disease: lessons from enteric infections. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1072:28-38. Epub 2006/10/24.
256. Mizoguchi A, Mizoguchi E. Inflammatory bowel disease, past, present and future: lessons from animal models. *J Gastroenterol.* 2008;43(1):1-17. Epub 2008/02/26.
257. Fasseu M, Treton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PloS one.* 2010;5(10). Epub 2010/10/20.
258. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology.* 2008;135(5):1624-35 e24. Epub 2008/10/07.
259. Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR. Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011;53(1):26-33. Epub 2011/05/07.
260. Podolska A, Kaczkowski B, Litman T, Fredholm M, Cirera S. How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta biochimica Polonica.* 2011;58(4):535-40. Epub 2011/12/08.
261. Doshi R, Day PJ, Tirelli N. Dissolved oxygen alteration of the spectrophotometric analysis and quantification of nucleic acid solutions. *Biochemical Society transactions.* 2009;37(Pt 2):466-70. Epub 2009/03/18.
262. Tsanev R, Markov GG. Substances interfering with spectrophotometric estimation of nucleic acids and their elimination by the two-wavelength method. *Biochimica et biophysica acta.* 1960;42:442-52. Epub 1960/08/26.
263. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques.* 1997;22(3):474-6, 8-81. Epub 1997/03/01.

264. Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstatter H, Parson W, Morling N. Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic science international Genetics*. 2008;2(3):226-30. Epub 2008/12/17.
265. Sellner LN, Coelen RJ, Mackenzie JS. Reverse transcriptase inhibits Taq polymerase activity. *Nucleic Acids Res*. 1992;20(7):1487-90. Epub 1992/04/11.
266. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*. 1999;26(1):112-22, 24-5. Epub 1999/01/23.
267. Mülhardt C. Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics. Spektrum Akademischer Verlag; 2008. p. 84-120.
268. Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnology letters*. 2010;32(12):1777-88. Epub 2010/08/13.
269. Zhu HT, Dong QZ, Wang G, Zhou HJ, Ren N, Jia HL, et al. Identification of suitable reference genes for qRT-PCR analysis of circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *Molecular biotechnology*. 2012;50(1):49-56. Epub 2011/05/14.
270. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008;14(5):844-52. Epub 2008/04/01.
271. Pekow JR, Dougherty U, Mustafi R, Zhu H, Kocherginsky M, Rubin DT, et al. miR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: putative regulators of inflammation and protooncogenes. *Inflamm Bowel Dis*. 2012;18(1):94-100. Epub 2011/05/11.
272. Waldmann A, Eberle A, Hentschel S, Holleczeck B, Katalinic A. [Population-based incidence rates of colorectal neoplasms (2000 - 2006) - has systematic colonoscopy screening an impact on incidence? A combined analysis of cancer registry data of the Federal States of Bremen, Hamburg, Saarland and Schleswig-Holstein]. *Z Gastroenterol*. 2010;48(12):1358-66. Epub 2010/12/03. Bevölkerungsbezogene Darmkrebsinzidenz im Zeitraum 2000 bis 2006 - Deuten sich erste Auswirkungen des Koloskopie-Screenings an? Eine gemeinsame Auswertung der Krebsregisterdaten aus Bremen, Hamburg, dem Saarland und Schleswig-Holstein.
273. Sarver AL. Toward understanding the informatics and statistical aspects of micro-RNA profiling. *Journal of cardiovascular translational research*. 2010;3(3):204-11. Epub 2010/06/19.
274. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS one*. 2009;4(5):e5540. Epub 2009/05/14.
275. Becker C, Hammerle-Fickinger A, Riedmaier I, Pfaffl MW. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. *Methods*. 2010;50(4):237-43. Epub 2010/01/19.
276. Chen Y, Ge W, Xu L, Qu C, Zhu M, Zhang W, et al. miR-200b is involved in intestinal fibrosis of Crohn's disease. *International journal of molecular medicine*. 2012;29(4):601-6. Epub 2012/02/02.
277. Kanaan Z, Rai SN, Eichenberger MR, Barnes C, Dworkin AM, Weller C, et al. Differential microRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer. *Human mutation*. 2012;33(3):551-60. Epub 2012/01/14.

278. Bian Z, Li L, Cui J, Zhang H, Liu Y, Zhang CY, et al. Role of miR-150-targeting c-Myb in colonic epithelial disruption during dextran sulphate sodium-induced murine experimental colitis and human ulcerative colitis. *J Pathol.* 2011;225(4):544-53. Epub 2011/05/19.
279. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis.* 2012. Epub 2012/03/06.
280. von Brandenstein M, Richter C, Fries JW. MicroRNAs: Small but amazing, and their association with endothelin. *Life sciences.* 2012. Epub 2012/07/10.
281. Wei J, Feng J. Signaling pathways associated with inflammatory bowel disease. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery.* 2010;4(2):105-17. Epub 2009/12/17.
282. Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene.* 2006;25(51):6758-80. Epub 2006/10/31.
283. Pasparakis M, Luedde T, Schmidt-Supprian M. Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell death and differentiation.* 2006;13(5):861-72. Epub 2006/02/14.
284. Wullaert A. Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis. *International journal of medical microbiology : IJMM.* 2010;300(1):49-56. Epub 2009/09/29.
285. Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, Gaudiosi D, Mirolo M, Mori L, et al. Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(13):5282-7. Epub 2009/03/18.
286. Iliopoulos D, Hirsch HA, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell.* 2009;139(4):693-706. Epub 2009/11/03.
287. Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doebis C, Loddenkemper C, Lexberg MH, et al. Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *J Exp Med.* 2008;205(8):1889-901. Epub 2008/07/30.
288. Marks DJ, Seymour CR, Sewell GW, Rahman FZ, Smith AM, McCartney SA, et al. Inflammatory bowel diseases in patients with adaptive and complement immunodeficiency disorders. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;16(11):1984-92. Epub 2010/09/18.
289. Liu M, Lang N, Chen X, Tang Q, Liu S, Huang J, et al. miR-185 targets RhoA and Cdc42 expression and inhibits the proliferation potential of human colorectal cells. *Cancer letters.* 2011;301(2):151-60. Epub 2010/12/28.
290. Staszal T, Zapala B, Polus A, Sadakierska-Chudy A, Kiec-Wilk B, Stepień E, et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej.* 2011;121(10):361-6. Epub 2011/09/29.
291. Wang YX, Zhang XY, Zhang BF, Yang CQ, Chen XM, Gao HJ. Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis. *Journal of digestive diseases.* 2010;11(1):50-4. Epub 2010/02/06.
292. Borchering F, Nitschke M, Hundorfean G, Rupp J, von Smolinski D, Bieber K, et al. The CD40-CD40L pathway contributes to the proinflammatory function of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *The American journal of pathology.* 2010;176(4):1816-27. Epub 2010/02/06.

293. Goulet I, Boisvenue S, Mokas S, Mazroui R, Cote J. TDRD3, a novel Tudor domain-containing protein, localizes to cytoplasmic stress granules. *Human molecular genetics*. 2008;17(19):3055-74. Epub 2008/07/18.
294. Thomas MG, Loschi M, Desbats MA, Boccaccio GL. RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cellular signalling*. 2011;23(2):324-34. Epub 2010/09/04.
295. Sui Y, Li YJ, Jin CX, Xu F. [Roles of REV3 in proliferation and genomic stability of colon carcinoma cells]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*. 2010;32(5):467-72. Epub 2010/05/15.
296. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Chiba C, Spiekermann GM, Tonegawa S, Nagler-Anderson C, et al. Cytokine imbalance and autoantibody production in T cell receptor-alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. *J Exp Med*. 1996;183(3):847-56. Epub 1996/03/01.
297. Philipsen EK, Bondesen S, Andersen J, Larsen S. Serum immunoglobulin G subclasses in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease of different disease activities. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1995;30(1):50-3. Epub 1995/01/01.
298. Harmsen HJ, Pouwels SD, Funke A, Bos NA, Dijkstra G. Crohn's disease patients have more IgG-binding fecal bacteria than controls. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2012;19(4):515-21. Epub 2012/02/18.
299. Santaolalla R, Abreu MT. Innate immunity in the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol*. 2012;28(2):124-9. Epub 2012/01/14.
300. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010;25 Suppl 1:S129-33. Epub 2010/07/14.
301. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(1):241-50. Epub 2010/09/03.
302. Polese L, Angriman I, Giuseppe DF, Cecchetto A, Sturniolo GC, Renata D, et al. Persistence of high CD40 and CD40L expression after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2005;11(34):5303-8. Epub 2005/09/09.
303. Fiocchi C. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *The American journal of physiology*. 1997;273(4 Pt 1):G769-75. Epub 1997/11/14.
304. Kawabe T, Matsushima M, Hashimoto N, Imaizumi K, Hasegawa Y. CD40/CD40 ligand interactions in immune responses and pulmonary immunity. *Nagoya journal of medical science*. 2011;73(3-4):69-78. Epub 2011/09/21.
305. Fiocchi C, Ina K, Danese S, Leite AZ, Vogel JD. Alterations of mesenchymal and endothelial cells in inflammatory bowel diseases. *Advances in experimental medicine and biology*. 2006;579:168-76. Epub 2006/04/20.
306. Furrie E, Macfarlane S, Cummings JH, Macfarlane GT. Systemic antibodies towards mucosal bacteria in ulcerative colitis and Crohn's disease differentially activate the innate immune response. *Gut*. 2004;53(1):91-8. Epub 2003/12/20.
307. Maystadt I, Rezsohazy R, Barkats M, Duque S, Vannuffel P, Remacle S, et al. The nuclear factor kappaB-activator gene PLEKHG5 is mutated in a form

- of autosomal recessive lower motor neuron disease with childhood onset. *American journal of human genetics*. 2007;81(1):67-76. Epub 2007/06/15.
308. Hong SK, Chaturvedi R, Piazuelo MB, Coburn LA, Williams CS, Delgado AG, et al. Increased expression and cellular localization of spermine oxidase in ulcerative colitis and relationship to disease activity. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16(9):1557-66. Epub 2010/02/04.
309. Heyninck K, Beyaert R. A novel link between Lck, Bak expression and chemosensitivity. *Oncogene*. 2006;25(12):1693-5. Epub 2005/09/28.
310. Naugler KM, Baer KA, Ropeleski MJ. Interleukin-11 antagonizes Fas ligand-mediated apoptosis in IEC-18 intestinal epithelial crypt cells: role of MEK and Akt-dependent signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(3):G728-37. Epub 2008/01/19.
311. Schiechl G, Bauer B, Fuss I, Lang SA, Moser C, Ruemmele P, et al. Tumor development in murine ulcerative colitis depends on MyD88 signaling of colonic F4/80+CD11b(high)Gr1(low) macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(5):1692-708. Epub 2011/04/27.
312. Allez M, Tieng V, Nakazawa A, Treton X, Pacault V, Dulphy N, et al. CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology*. 2007;132(7):2346-58. Epub 2007/06/16.
313. Zhao J, Jiang Y, Lei Y, Zou K, Wang C, Huang S, et al. Functional MICA-129 polymorphism and serum levels of soluble MICA are correlated with ulcerative colitis in Chinese patients. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011;26(3):593-8. Epub 2010/12/16.
314. Kobayashi T, Matsuoka K, Sheikh SZ, Elloumi HZ, Kamada N, Hisamatsu T, et al. NFIL3 is a regulator of IL-12 p40 in macrophages and mucosal immunity. *J Immunol*. 2011;186(8):4649-55. Epub 2011/03/09.
315. Pandit KV, Milosevic J, Kaminski N. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 2011;157(4):191-9. Epub 2011/03/23.
316. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(10):775-89. Epub 2010/10/05.

8 Anhang

8.1 Vergleich von Datenbankinhalten zu den in der Expression veränderten miRNAs

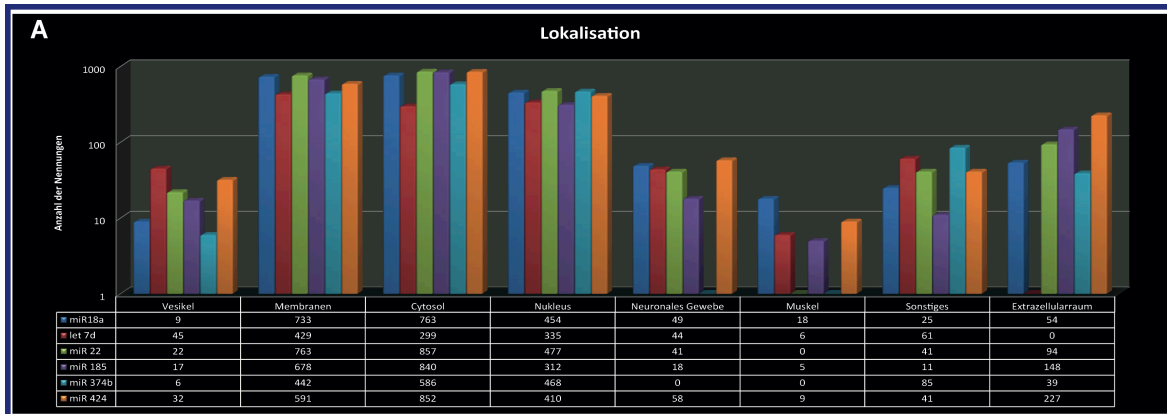


Abbildung 37 Vergleich der räumlichen Verteilung der miRNAs

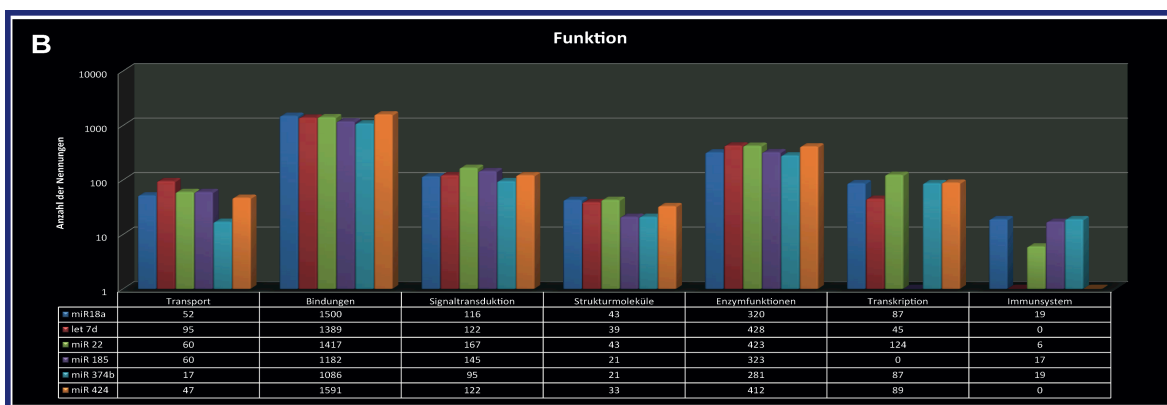


Abbildung 38 Vergleich der wahrgenommenen Funktionen der untersuchten miRNAs

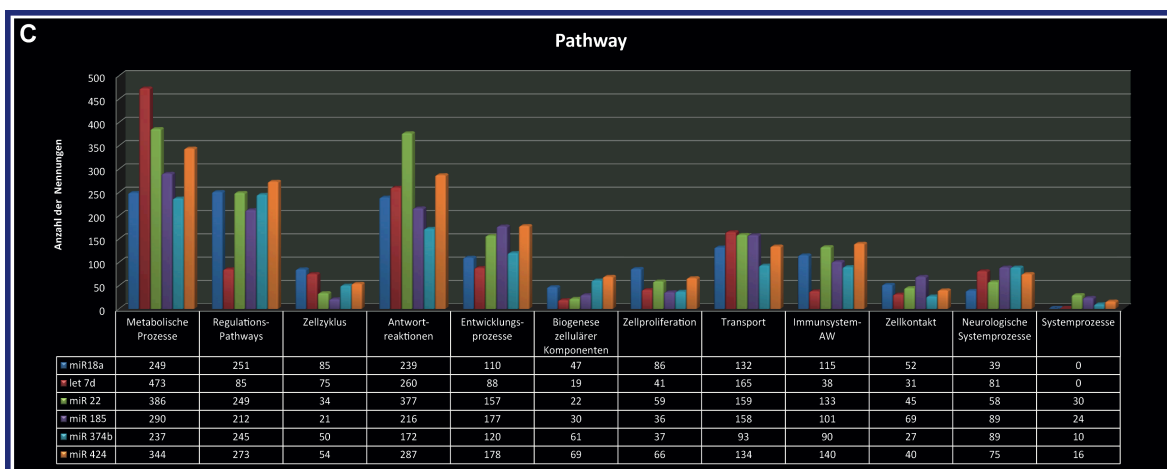


Abbildung 39 Vergleich der durch die untersuchten miRNAs regulierten Pathways

D Protein-Treffer

Protein	Nennungen	Chromosom	Protein	Nennungen	Chromosom	Protein	Nennungen	Chromosom	Protein	Nennungen	Chromosom	Protein	Nennungen	Chromosom	Protein	Nennungen	Chromosom
miR 18a			let 7d			miR 22			miR 185			miR 27/b			miR 424		
C21orf63	4	21q22.11	LLGL2	4	17q25.1	UGT1A1	4	2q37	MOG	4	6p22.1	C10orf88	4	10q26.13	MRPS2	4	9q34
DSG4	4	18q12.1	PHPT1	4	9q43.3	UTRN	4	6q24	S100A1	4	1q21	CCPG1	4	15q21.1	NP_001007552.1	4	Xq26.3
FGFR2	4	10q26	PIK3AP1	4	10q24.1	HDAC8	5	Xq13	SEC24C	4	10q22.2	FMRI	4	Xq27.3	PCMT1	4	6q24-25
HSPA6	4	1q23	RNF20	4	9q22	MRPL23	5	11p15.5	SLC29A1	4	6p21.1	GADD45A	4	1p31.2	PJA1	4	Xq13.1
MAGEA6	4	Xq28	RPUSD3	4	3p25.3	TPM3	5	1q21.2	TMEM116	4	12q24.13	LTBP1	4	2p22-p21	VCAM1	4	1p32-31
NPL	4	1q25	SERPING1	4	11q12-13.1	CIDEA	6	3p25.3	ZNF193	4	6p21.3	NFIL3	4	9q22	ZDHHC16	4	10q24.1
PCID2	4	13q34	SMOX	4	20p13	TAF1C	6	16q24	DIO1	5	1p33-32	PNRC1	4	6q15	RG53	5	9q32
RAG1AP1	4	1q22	C20orf119	5	20	GUK1	8	1q32-41	LCK	6	1p34.3	PTPLA	4	10p14-13	TGIF2LY	6	Yp11.2
MAP7D1	5	1p34.3	UROS	5	10q25.2-26.3	ZDHHC16	8	10q24.1	Q13060_HUMAN	7	4q35.2	ZMYM1	9	1p34.3	APTX	7	9p13.3
MICA	5	6p21.33	PLEKHG5	6	1p36.31	C6orf98	9	6q28.1	SPRR2F	9	1q21-22	ACSL6	10	5q31	CD40	11	20q12-13.2

Abbildung 40 Protein-Treffer zu den 10 am häufigsten durch die jeweilige miRNA regulierten Proteinen; gelbe Hervorhebungen symbolisieren Proteine, welche bereits in anderen wissenschaftlichen Publikationen als relevant für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen nachgewiesen wurden

8.2 Der NF-kB-Signalweg

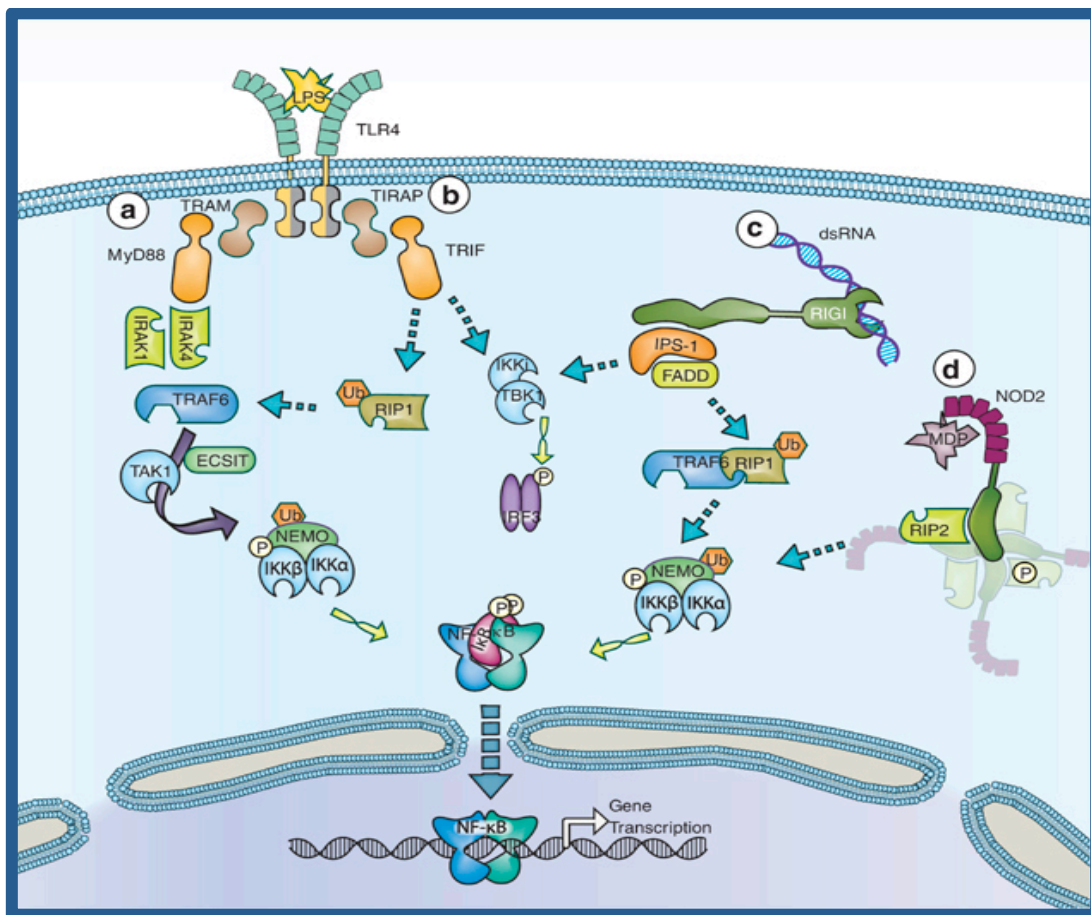


Abbildung 41 Vereinfachte Darstellung des NF-kB-Signalweges; entnommen aus dem Review von M. S. Hayden, A. P. West und S. Ghosh: NF-kB and the immune response. Oncogene. 2006

Über Stimulation von Toll-like-Rezeptoren kommt es letztlich zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Diese Kinase besteht aus den katalytischen Einheiten IKK α und IKK β sowie der regulatorischen Einheit NEMO. Durch Aktivierung des IKK-Komplexes erfolgt eine Phosphorylierung des inhibitorisch wirkenden I κ B Proteins, welches an den NF-kB Komplex gebunden ist. Durch den Phosphorylierungsschritt des I κ B-Proteins kommt es zur Ubiquitinierung und dadurch bedingten proteosomalen Abbau dieses inhibitorischen Proteins. Dadurch wird die Überführung des NF-kB-Proteins aus dem Zytosol in den Zellkern ermöglicht, wodurch die Transkription von NF-kB abhängigen Zielgenen eingeleitet wird

8.3 Statistische Angaben zu den mit der Software Cytoscape und dem Plug-In ClueGO erhobenen Daten

GOID	GO-Term	%asso- zierter Gene	Term p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gruppen p- Wert korrigiert n. Bonferroni	Gen
43383	negative T cell selection	7,692	1	0,33	<i>FAS</i>
45061	thymic T cell selection	5,556	1	0,33	<i>FAS</i>
45060	negative thymic T cell selection	8,333	0,96	0,33	<i>FAS</i>
50858	negative regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	8,333	0,96	0,37	<i>PHPT1</i>
50856	regulation of T cell receptor signaling pathway	5	1	0,37	<i>PHPT1</i>
50860	negative regulation of T cell receptor signaling pathway	9,091	0,88	0,37	<i>PHPT1</i>
1869	negative regulation of complement activation, lectin pathway	50	0,16	N/A	<i>SERPIN G1</i>
2223	stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	50	0,16	N/A	<i>MICA</i>
45651	positive regulation of macrophage differentiation	20	0,4	N/A	<i>CALCA</i>
45671	negative regulation of osteoclast differentiation	5,882	1	N/A	<i>CALCA</i>
70431	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 signaling pathway	16,662	0,48	N/A	<i>RELA</i>

Tabelle 37 Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d und miR-30e regulierten Proteine; der jeweilige Term-Leader wurde über Fettdruck hervorgehoben

GOID	GO-Term	%assoziierter Gene	Term p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gruppen p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gen
45191	regulation of isotype switching	5,882	0,96	0,3	<i>CD40</i>
45830	positive regulation of isotype switching	8,333	0,68	0,3	<i>CD40</i>
48302	regulation of isotype switching to IgG isotypes	10	0,56	0,3	<i>CD40</i>
48291	isotype switching to IgG isotypes	9,091	0,64	0,3	<i>CD40</i>
48304	positive regulation of isotype switching to IgG isotypes	14,286	0,39	0,3	<i>CD40</i>
50857	positive regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	10	0,56	0,49	<i>LCK</i>
50856	regulation of T cell receptor signaling pathway	5	1	0,49	<i>LCK</i>
50862	positive regulation of T cell receptor signaling pathway	16,667	0,34	0,49	<i>LCK</i>
45586	regulation of gamma-delta T cell differentiation	14,286	0,39	0,49	<i>LCK</i>
45588	positive regulation of gamma-delta T cell differentiation	14,286	0,39	0,49	<i>LCK</i>
34123	positive regulation of toll-like receptor signaling pathway	10	0,56	0,2	<i>MOG</i>
34124	regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	33,333	0,17	0,2	<i>MOG</i>
34126	positive regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	100	0,057	0,2	<i>MOG</i>
34162	toll-like receptor 9 signaling pathway	33,333	0,17	N/A	<i>TNIP2</i>
45657	positive regulation of monocyte differentiation	25	0,22	N/A	<i>CTNNBIP1</i>

Tabelle 38 Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der miRNAs miR-30e, miR-185, miR-374b und miR-424; jeweiliger Term-Leader über Fettdruck hervorgehoben

GOID	GO-Term	%assoziierter Gene	Term p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gruppen p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gen
45191	regulation of isotype switching	5,882	1	0,35	<i>CD40</i>
45830	positive regulation of isotype switching	8,333	0,94	0,35	<i>CD40</i>
48302	regulation of isotype switching to IgG isotypes	10	0,79	0,35	<i>CD40</i>
48291	isotype switching to IgG isotypes	9,091	0,87	0,35	<i>CD40</i>
48304	positive regulation of isotype switching to IgG isotypes	14,286	0,55	0,35	<i>CD40</i>
50857	positive regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	10	0,79	0,29	<i>LCK</i>
50862	positive regulation of T cell receptor signaling pathway	16,667	0,47	0,29	<i>LCK</i>
45586	regulation of gamma-delta T cell differentiation	14,286	0,55	0,29	<i>LCK</i>
45588	positive regulation of gamma-delta T cell differentiation	14,286	0,55	0,29	<i>LCK</i>
34123	positive regulation of toll-like receptor signaling pathway	10	0,79	0,23	<i>MOG</i>
34124	regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	33,333	0,23	0,23	<i>MOG</i>
34126	positive regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	100	0,079	0,23	<i>MOG</i>
1869	negative regulation of complement activation, lectin pathway	50	0,15	N/A	<i>SERPING1</i>
34162	toll-like receptor 9 signaling pathway	33,333	0,23	N/A	<i>TNIP2</i>
45657	positive regulation of monocyte differentiation	25	0,31	N/A	<i>CTNNBIP1</i>
50854	regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	7,692	0,29	N/A	<i>LCK, PHPT1</i>
50856	regulation of T cell receptor signaling pathway	10	0,17	N/A	<i>LCK, PHPT1</i>
50858	negative regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	8,333	0,94	N/A	<i>PHPT1</i>
50860	negative regulation of T cell receptor signaling pathway	9,091	0,87	N/A	<i>PHPT1</i>

Tabelle 39 Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs let-7d, miR-185 und miR-424 regulierten Proteine; jeweiliger Term-Leader über Fettdruck hervorgehoben

GOID	GO-Term	%assoziierter Gene	Term p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gruppen p-Wert korrigiert n. Bonferroni	Gen
50857	positive regulation of antigen receptor-mediated signaling pathway	10	0,62	0,5	<i>LCK</i>
50856	regulation of T cell receptor signaling pathway	5	1	0,5	<i>LCK</i>
50862	positive regulation of T cell receptor signaling pathway	16,667	0,37	0,5	<i>LCK</i>
45586	regulation of gamma-delta T cell differentiation	14,286	0,44	0,5	<i>LCK</i>
45588	positive regulation of gamma-delta T cell differentiation	14,286	0,44	0,5	<i>LCK</i>
34123	positive regulation of toll-like receptor signaling pathway	10	0,62	0,21	<i>MOG</i>
34124	regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	33,333	0,18	0,21	<i>MOG</i>
34126	positive regulation of MyD88-dependent toll-like receptor signaling pathway	100	0,063	0,21	<i>MOG</i>
1865	NK T cell differentiation	16,667	0,37	N/A	<i>TXK</i>
2223	stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway	50	0,12	N/A	<i>MICA</i>
30853	negative regulation of granulocyte differentiation	16,667	0,37	N/A	<i>C1QC</i>
45650	negative regulation of macrophage differentiation	16,667	0,37	N/A	<i>C1QC</i>

Tabelle 40 Statistische Angaben zum Interaktionsnetzwerk der durch die miRNAs miR-18a und miR-185 regulierten Proteine; Term-Leader über Fettdruck hervorgehoben

