

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

microRNA-155 und -146a:
Expressionsanalyse in der Kolonmukosa von Morbus Crohn- und Colitis Ulzerosa-
Patienten und Einfluss der Überexpression auf die Epithelbarriere im Zellkulturmodell

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philipp Seiß

aus München

Datum der Promotion: 17. September 2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
Abstract	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED).....	1
1.2. Veränderungen der Darmbarriere bei CED	2
1.3. Wirkweise von microRNA (miR)	5
1.4. Forschungsstand zu miR-155 und -146a im Kontext der CED	6
2. Fragestellung	9
3. Ethik	10
4. Material und Methoden	11
4.1. Geräte und Materialien	11
4.2. Humanproben.....	19
4.3. miR-Extraktion	20
4.4. Reverse Transkription	21
4.5. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion	22
4.6. Auswertung der miR-Expressionslevel mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode	24
4.7. Zellkultur aus miR-Überexpressionsklonen	26
4.8. Messung des transepithelialen Widerstandes (TER).....	27
4.9. Proteinextraktion und –quantifizierung	28
4.10. Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese	29
4.11. Western Blot und Immundetektion.....	31
4.12. Auswertung der Zellkulturversuche	34

5. Ergebnisse	35
5.1. Expressionsanalyse von miR-155 und -146a bei MC und CU	35
5.1.1. Patientenkollektiv.....	35
5.1.2. Expressionsanalyse von miR-155 in der Kolonmukosa bei CU	38
5.1.3. Expressionsanalyse von miR-155 in der Kolonmukosa bei MC	39
5.1.4. miR-155 als Unterscheidungsmerkmal zwischen MC und CU	39
5.1.5. Expressionsanalyse von miR-146a in der Kolonmukosa bei CU	40
5.1.6. Expressionsanalyse von miR-146a in der Kolonmukosa bei MC	41
5.1.7. miR-146a als Unterscheidungsmerkmal zwischen MC und CU	41
5.2. Einfluss der miR-146a- und -155-Überexpression auf die Barrierefunktion im HT29/B6-Zellkulturmodell	42
5.2.1. Einfluss der Überexpression auf den TER.....	42
5.2.2. Einfluss der Überexpression auf die Proteinlevel von CLDN-1 und -2.	43
6. Diskussion.....	45
6.1. Expression von miR-155 und -146a in Abhängigkeit der Inflammation	45
6.2. Limitationen	48
6.3. Einfluss von miR-155 und -146a auf die Barrierefunktion im Zellmodell.....	50
Literaturverzeichnis	51
Eidesstattliche Versicherung	57
Curriculum Vitae	59
Danksagung	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.	11
Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.	13
Tabelle 3: Gebrauchsfertige Kits/Lösungen.	14
Tabelle 4: Zelllinien.	15
Tabelle 5: Antikörper.	15
Tabelle 6: Primer/Sonden.	16
Tabelle 7: Mastermixe.	16
Tabelle 8: Zellkulturmedium Zusätze.	16
Tabelle 9: Puffer.	17
Tabelle 10: Temperaturzyklus des RT-Thermocyclers.	21
Tabelle 11: Temperaturzyklus des qRT-PCR-Cyclers.	22
Tabelle 12: Übersicht über die Patientendaten.	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inflammatorisch bedingte Barrierestörung.	3
Abbildung 2: Proteinsynthesehemmung durch miR.	6
Abbildung 3: Kolonpräparat eines CU-Patienten.	19
Abbildung 4: Vergleich der C _t -Werte von 2 Proben.	23
Abbildung 5: TER-Messung.	27
Abbildung 6: Prinzip der Gelelektrophorese.	30
Abbildung 7: Prinzip der Immundetektion.	33
Abbildung 8: Erhöhte Expression von miR-155 in entzündeter Mukosa bei CU.	38
Abbildung 9: Erhöhte Expression von miR-155 in entzündeter Mukosa bei MC.	39
Abbildung 10: Expression von miR-146a bei CU.	40
Abbildung 11: Keine Expressionsunterschiede von miR-146a zwischen entzündeten und nicht-entzündeten MC-Arealen und Kontrolle.	41
Abbildung 12: TER in miR-146a- und miR-155-Überexpressionsklonen.	42
Abbildung 13: Keine Expressionsunterschiede von CLDN-1 in den Überexpressionsklonen.	43
Abbildung 14: Keine Expressionsunterschiede von CLDN-2 in den Überexpressionsklonen.	44

Abkürzungsverzeichnis

BMI	<i>Bodymaß-Index</i>
BSA	<i>bovines Serumalbumin</i>
cDNA	<i>komplementäre DNA</i>
CED	<i>chronisch-entzündliche Darmerkrankung</i>
CLDN.....	<i>Claudin</i>
CU	<i>Colitis Ulzerosa</i>
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i>
IFN- γ	<i>Interferon γ</i>
IL-13	<i>Interleukin 13</i>
kDa	<i>kilo-Dalton</i>
MC	<i>Morbus Crohn</i>
min.....	<i>Minute(n)</i>
miR	<i>microRNA</i>
mRNA.....	<i>messenger RNA</i>
PAA	<i>Polyacrylamid</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
rpm	<i>Umdrehungen pro min. (engl.: rotations per minute)</i>
RT.....	<i>reverse Transkription</i>
SB.....	<i>Schwankungsbreite</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
TBI	<i>traumatischer Hirnschaden (engl. traumatic brain injury)</i>
TER	<i>transepithelialer Widerstand</i>
TJ	<i>Tight Junction</i>
TNF- α	<i>Tumor-Nekrose-Faktor α</i>

Zusammenfassung

Die Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulzerosa (CU) ist bis heute unklar, es werden multifaktorielle Krankheitsauslöser vermutet. Sowohl MC als auch CU gehen mit Diarrhöen und einer schweren Inflammation einzelner Abschnitte oder des gesamten Gastrointestinaltraktes einher. Es liegt eine Barrierestörung des Darmepithels vor, die unter anderem durch eine veränderte Proteinexpression und Komplexität der Tight Junction (TJ)-Proteine charakterisiert ist. In den letzten Jahren zeigte sich, dass microRNAs (miRs) Einfluss auf das Krankheitsgeschehen der CED haben könnten, da für zahlreiche miRs Expressionsunterschiede zwischen gesunden und an CED erkrankten Patienten nachgewiesen werden konnten. In Maus- und Zellkulturversuchen konnten bereits Einflüsse von zahlreichen miRs auf Proteinexpression und Darmbarriereigenschaften gefunden werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob miR-155 und miR-146a in Abhängigkeit der mukosalen Entzündung bei CED-Patienten verändert exprimiert werden und ob eine gesteigerte Expression dieser beiden miRs einen Einfluss auf die epitheliale Barrierefunktion hat. Zunächst wurden die Expressionslevel von miR-155 und miR-146a in humaner Kolonmukosa, die aus Operationsresektaten und Biopsien gewonnen wurde, bestimmt. Es zeigte sich, dass miR-155 sowohl bei MC als auch bei CU in entzündeter Mukosa im Vergleich zu gesunden Kontrollen verstärkt exprimiert wird. In nicht-entzündeter Kolonmukosa zeigte sich keine veränderte Expression, was die Vermutung unterstreicht, dass miR-155 an inflammatorischen Prozessen beteiligt sein könnte. Eine verstärkte Expression der miR-146a dagegen wurde nur in entzündeter Kolonmukosa von CU, nicht dagegen in entzündeten MC-Arealen, nachgewiesen.

Um zu untersuchen, ob die beiden genannten miRs ursächlich für die mit CED assoziierten Störungen der intestinalen Barrierefunktion und somit auch für Krankheitssymptome verantwortlich sein könnten, wurden miR-155- und miR-146a-Überexpressionsklone der humanen Kolonkarzinomzelllinie (HT29/B6) in einem epithelialen Zellkulturmodell untersucht. Messungen des transepithelialen Widerstandes (TER) über einem Filterinsert mit darauf kultivierten epithelialen Zellmonolayern zeigten keine Unterschiede zwischen Überexpressionsklonen und Vektorkontrolle. Der TER ist ein Maß für die Barriereintegrität und lässt Rückschlüsse auf die Barrierefunktion zu. Nach Lyse der Zellen wurde ferner die Expression der

barriererelevanten TJ-Proteine Claudin-1 und -2 mittels Western Blot untersucht. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Überexpressionsklonen und Vektorkontrolle. Somit konnten keine Hinweise dafür gefunden werden, dass die untersuchten miRs einen direkten Einfluss auf die Epithelbarriere nehmen.

In der Zusammenschau der gewonnenen Erkenntnisse kann vermutet werden, dass die Expressionszunahme der miR-155, und möglicherweise auch die der miR-146a, in Abhängigkeit der Entzündung in der Kolonmukosa erfolgt. Die Ergebnisse der in-vitro-Versuche am Zellmodell sprechen gegen einen direkten Einfluss der beiden miRs auf die Barrierefunktion.

Abstract

The pathogenesis of the chronic inflammatory bowel diseases (IBD), Crohn's disease (MC) and Ulcerative colitis (CU) is currently unclear, multifactorial triggers are suspected. Both MC and CU are associated with diarrhea and a severe inflammation of parts of the gastrointestinal tract. One reason for the diarrhea is a barrier disorder of the intestinal epithelium, characterized by an altered composition of Tight Junction (TJ) proteins that connect intestinal cells. microRNAs (miRs) could have an influence on the course of IBD, as differences in their expression-levels between IBD and healthy patients could be determined. In mouse- and cell culture- experiments, the effects of several miRs on protein expression and intestinal barrier properties have already been proven.

In this work it was investigated whether an enhanced mucosal expression of miR-155 and miR-146a depends on the mucosal inflammation in IBD patients and whether an increased expression of these two miRs has an influence on the epithelial barrier properties. First, the expression-levels of miR-155 and miR-146a in human colon specimens obtained from surgical resections and biopsies were determined. It was found that miR-155 was increased in both MC and UC in inflamed colonic mucosa compared with healthy controls. In non-inflamed mucosa, there was no expression-change, underlining the assumption that miR-155 could be involved in inflammatory processes. An increased expression of miR-146a, however, was only detected in inflamed mucosal areas of CU, but not in inflamed areas of MC.

In order to investigate whether miR-155 and miR-146a might be responsible for alterations of the intestinal barrier associated with IBD, miR-155- and miR-146a-overexpression clones of the human colon carcinoma cell line HT29/B6 were examined in an epithelial cell culture model. Measurements of the transepithelial resistance (TER), an indicator for barrier integrity, of an epithelial cellmonolayer, showed no differences between overexpression clones and vectorcontrol. After lysing the cells, the expression of two barrier-relevant TJ-proteins claudin-1 and -2 were determined by means of Western blot. Here, too, no difference between overexpression clones and vectorcontrol were found.

In conclusion, it can be assumed that the expression-increase of miR-155, and possibly also miR-146a, takes place depending on the inflammation in the colonic mucosa. The

results of the in-vitro cell culture studies did not point on an immediate influence of miR-155 or miR-146a on the epithelial barrier function.

1. Einleitung

1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Morbus Crohn (MC) und Colitis Ulzerosa (CU) sind zwei Erkrankungen aus der Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Bei der CU ist der Dickdarm von einer vom Rektum nach oral aufsteigenden Entzündung betroffen. Beim MC können mehrere räumlich voneinander getrennte (segmentale) Entzündungsherde vorliegen, die nicht nur im Dickdarm, sondern auch in Dünndarm, Magen oder Speiseröhre, auftreten können. Klinisch können sich beide Erkrankungen durch vielfältige Symptome äußern. Regelmäßig finden sich - vor allem in den Entzündungsschüben - Abdominalschmerzen, Fieber, blutig oder schleimige Durchfälle, Gewichtsverlust und eine allgemein reduzierte Lebensqualität (Herold, 2018). Die Erkrankungen können histologisch und morphologisch unterschieden werden, wobei es selten vorkommt, dass die Erscheinungsform nicht klar einer der beiden Erkrankungen zugewiesen werden kann (Allgemeine und spezielle Pathologie 5. Auflage, 2004).

Beide Erkrankungen sind Zivilisationskrankheiten. Das bedeutet, ihre Inzidenz steigt mit steigendem Lebensstandard der Bevölkerung. Da der Lebensstandard in fast allen Teilen der Welt über die letzten Jahrzehnte stetig zugenommen hat, beobachtete man auch weltweit steigende Fallzahlen. Aktuell treten beide Erkrankungen in Deutschland mit einer Inzidenz von circa 6/100.000 Neuerkrankungen pro Jahr auf (Herold, 2018), (Burisch & Munkholm, 2015). Das verursacht hohe Behandlungskosten für das Gesundheitssystem (Stallmach, Häuser, L'hoest, & Marschall, 2019).

Oft kann die oben beschriebene Symptomatik durch antientzündliche Arzneien und eine Umstellung der Lebensgewohnheiten reduziert werden. Ist das nicht ausreichend, kann eine Operation nötig werden. Eine kausale Therapie kann bei CU durch vollständige operative Entfernung des Dickdarms erfolgen. Der MC ist nicht heilbar (Herold, 2018). Die Patienten stehen aufgrund von Einschränkungen im Alltag, Symptomatik, Nebenwirkungen der Medikation und potentiell nötigen operativen Eingriffen unter hohem Leidensdruck.

Die Pathogenese der CED ist noch ungeklärt. Es werden multifaktorielle Ursachen vermutet. Das bedeutet, dass die CED vermutlich durch eine Kombination aus Genetik, individueller Prädisposition und Lebensgewohnheiten verursacht werden (Burisch & Munkholm, 2015).

1.2. Veränderungen der Darmbarriere bei CED

Aktuell wird davon ausgegangen, dass eine endogene Immunregulationsstörung und ein verstärkter Übertritt luminaler Antigene aus dem Darmlumen in die Zirkulation eine sich gegenseitig verstärkende chronische intestinale Entzündung verursachen: Durch eine endogene Immunregulationsstörung multifaktorieller Ätiologie kommt es zu einer Inflammation und dadurch bedingt zu einer dysregulierten Expression und Lokalisation von Proteinen, die für die Integrität des Darmepithels verantwortlich sind. Durch die dysregulierten Tight Junction (TJ)-Proteine ist die Epithelintegrität verändert und die Permeabilität für luminale Noxen wie Nahrungsmittelbestandteile, Allergene und mikrobielle Antigene erhöht. Immunzellen in der Darmmukosa werden durch diese Antigene aktiviert und eine zusätzliche Immunantwort getriggert. Dadurch verschlimmern bzw. unterhalten die luminalen Antigene die Entzündung und die Durchlässigkeit der Epithelzellschicht bleibt beeinträchtigt (Zhu, et al., 2019), (Cao, et al., 2017). Es kommt zu einem Teufelskreis (Martini, Krug, Siegmund, Neurath, & Becker, 2017); (Abbildung 1). Die pathologisch veränderte Durchlässigkeit der Darmbarriere für H₂O durch die Entzündung ist mitverantwortlich für die Diarrhöen der CED-Patienten (Cichon, Sabharwal, Rüter, & Schmidt, 2014).

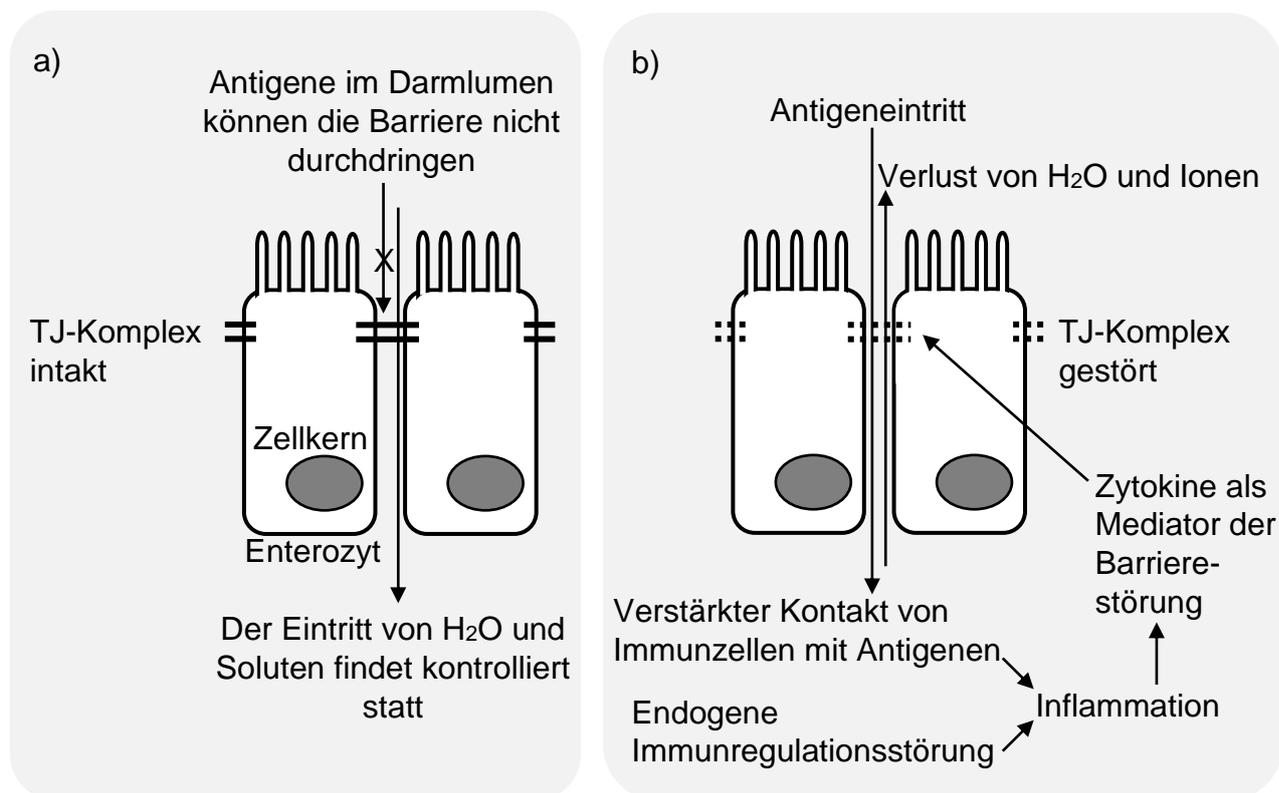


Abbildung 1: Inflammatorisch bedingte Barriestörung. a) Die gesunde Darmbarriere, die einen geregelten Austausch von Soluten und Wasser zwischen Darm und Körper ermöglicht, wird durch eine polarisierte Epithelzellschicht aus Enterozyten gebildet. Eine der wichtigsten Strukturen für die Epithelintegrität ist der TJ-Komplex, der sich apikal an den polarisierten Epithelzellen befindet. b) Durch eine intestinale Inflammation wird die Darmbarriere durchlässiger, wodurch Antigene eindringen können. Diese Antigene triggern bzw. verschlimmern die Inflammation. Es kommt zu einer gegenseitigen Verstärkung von Antigeneintritt und Durchlässigkeit der Darmbarriere. Zytokine vermitteln die Entzündungsantwort. Durch die Epitheldefekte treten Wasser und Ionen unkontrolliert ins Darmlumen über, dies ist mitverantwortlich für die Diarrhöen bei CED-Patienten.

Eine Schlüsselfunktion in der Mediation der Inflammation kommen proinflammatorischen Zytokinen zu. Untersuchungen zeigten, dass der Tumornekrose-Faktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ) bei MC und TNF- α und Interleukin 13 (IL-13) bei CU im Darmepithel erhöht sind (John, Fromm, & Schulzke, 2011). Diese Mediatoren nehmen Einfluss auf die Expression von Proteinen der Epithelbarriere, zusammengefasst in (Hering, Fromm, & Schulzke, 2012). Die bedeutendsten Proteine für die Epithelintegrität finden sich in einem apikalen Zellkomplex an den polarisierten Epithelzellen der Darmmukosa (Enterozyten), der als TJ-Komplex bezeichnet wird. Dieser Komplex setzt sich aus Claudinen (CLDN), Tight Junction-assoziierten MARVEL-Proteinen und Junctional adhesion molecules zusammen. Diese Transmembranproteine interagieren mit intrazellulären Gerüstproteinen, wie den Zonula Occludens-Proteinen (ZO 1-3) und bilden ein Netzwerk, das die Zellen gürtelartig umgibt und abdichtet (Oshima & Miwa, 2016). Der TJ-Komplex reguliert dadurch den passiven parazellulären Fluss von Soluten und Wasser aus dem Darmlumen über die Darmbarriere (Zhu, et al., 2019), (Cichon, Sabharwal, Rüter, & Schmidt, 2014), den Durchtritt von Nahrungsmittel- und Bakterienantigenen, und dadurch die Immuntoleranz gegenüber Kommensalen, sowie die Abgrenzung gegenüber Darmpathogenen (Oshima & Miwa, 2016). Eine der wichtigsten Komponenten des TJ-Komplexes sind die Claudine (CLDN), eine Gruppe aus inzwischen 27 bekannten Transmembranproteinen (Oshima & Miwa, 2016). Einige Vertreter dieser Gruppe wie beispielsweise CLDN-1 dichten die TJ ab, andere wie beispielsweise CLDN-2 bilden Kanäle und erhöhen damit die Durchlässigkeit der Darmbarriere (Zhu, et al., 2019), (Garcia-Hernandez, Quiros, & Nusrat, 2017). Wie sich gezeigt hat, wird CLDN-2 sowohl bei MC (Zeissig, et al., 2006) als auch bei CU hochreguliert (Heller, et al., 2005). CLDN-1 ist bei CU herunterreguliert (Heller, et al., 2005).

1.3. Wirkweise von microRNA (miR)

Circa 2% des menschlichen Genoms kodieren für messenger RNA (mRNA). Aus der mRNA werden die Proteine lebender Organismen gebildet (Mahesh & Biswas, 2019). Die mRNA-Expression und damit auch die Proteinexpression kann durch microRNA (miR) reguliert werden. miR sind einzelsträngige RNA-Moleküle von geringer Länge (circa 20-27 Nukleotide). Sie kodieren nicht für Proteine, sondern interagieren mit mRNA (mRNA). Dadurch greifen sie in die Expression von Proteinen ein und fungieren so als posttranskriptionelle Regulatoren. Dies beeinflusst die Zellaktivitäten (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzhig, 2017). Deshalb wird vermutet, dass eine veränderte miR-Expression Fehlregulationen der Zelle zur Folge haben kann. Dies konnte in zahlreichen Studien auch belegt werden (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzhig, 2017). Inzwischen sind mehrere Tausend miRs bekannt (Cichon, Sabharwal, Rüter, & Schmidt, 2014).

miR wird im Zellkern ähnlich hergestellt, wie andere RNA auch (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzhig, 2017): Die RNA-Polymerase II erzeugt aus der DNA ein primäres Transkript (pri-miR), das durch das Enzym Drosha, ein RNase III-Enzym, verkürzt wird. Das so erzeugte Produkt wird als precursor-microRNA (pre-miR) bezeichnet. Diese pre-miR wird aus dem Zellkern ins Zytoplasma ausgeschleust. Hier wird durch das Enzym Dicer, ebenfalls ein RNase III-Enzym, ein weiterer Teil der pre-miR abgespalten, und es entsteht so die ausgereifte miR. Diese miR wird in den RNA-induced silencing complex (RISC) eingebaut. Innerhalb dieses Komplexes dient die miR als Vorlage, um die Ziel-mRNA über partielle Hybridisierung zu erkennen (Guil & Esteller, 2015) (

Abbildung 2). Durch die Interaktion von miR mit dem 3'-Ende der Ziel-mRNA wird die Nuklease-Aktivität von RISC aktiviert und die mRNA entweder abgebaut oder deren Translation verhindert. Es wird davon ausgegangen, dass $\frac{2}{3}$ der menschlichen Gene durch posttranskriptionelle miR-Mechanismen reguliert werden. miR kann so als positiver oder negativer Feedback-Loop wirken. Mutationen bzw. Fehlfunktionen von Drosha oder Dicer, die beide elementar für die Produktion der miR sind, können Erkrankungen hervorrufen. Daher wird davon ausgegangen, dass miR wichtige Funktionen im Organismus übernehmen (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzhig, 2017).

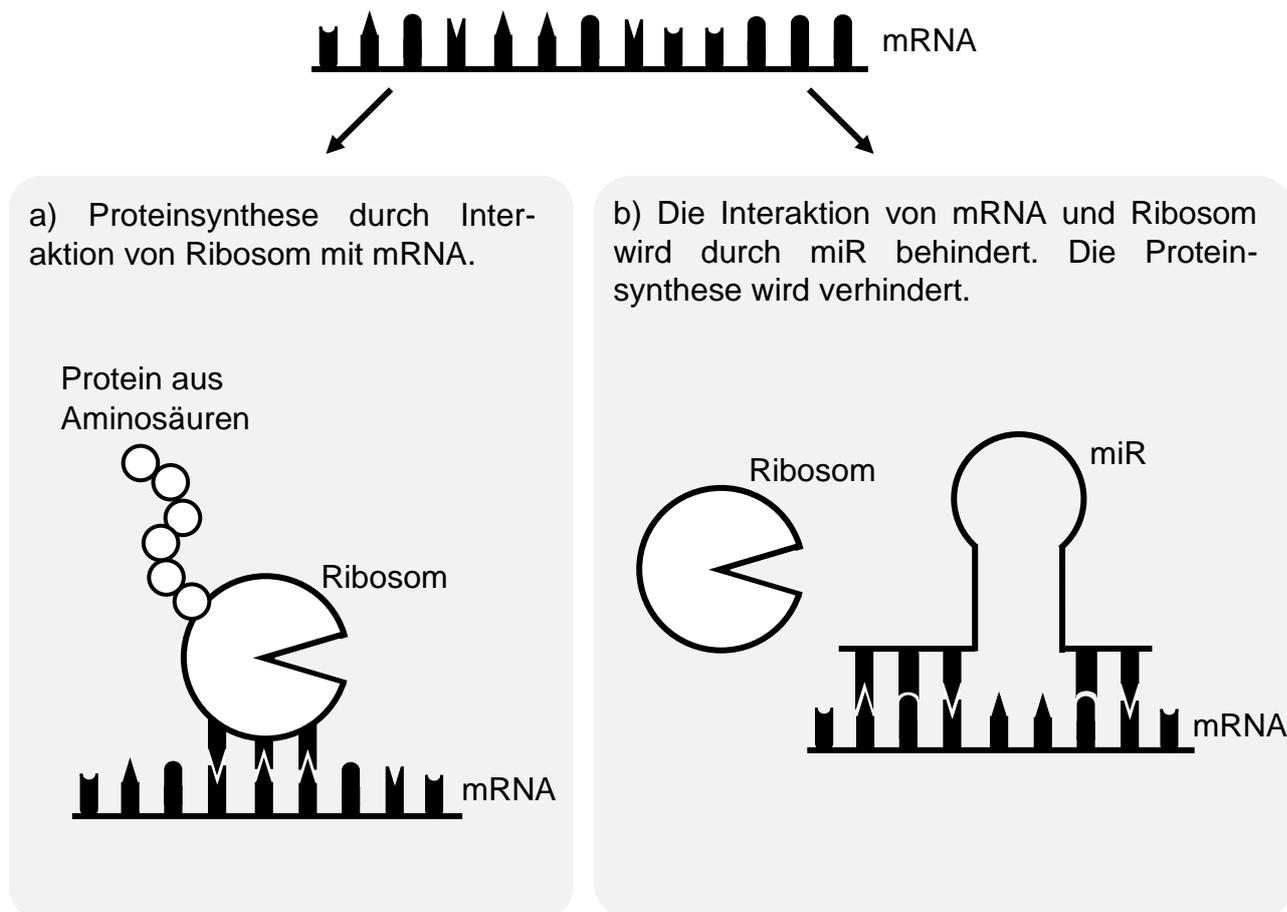


Abbildung 2: Proteinsynthesehemmung durch miR. a) mRNA wird durch Ribosomen in eine Aminosäurekette translatiert. b) Durch partielle Hybridisierung komplementärer Basen zwischen mRNA und miR, die im RISC-Komplex eingebaut ist (hier nicht eingezeichnet), wird die Aminosäure-Translation verhindert.

1.4. Forschungsstand zu miR-155 und -146a im Kontext der CED

2008 wurde erstmalig miR aus Darmmukosa von CED-Patienten extrahiert und Expressionsunterschiede gegenüber gesunden Patienten festgestellt (Wu, et al., 2008), (Béres, et al., 2016). Aufgrund zahlreicher weiterer Forschungsarbeiten mehren sich seitdem die Hinweise, dass miRs regulatorisch in den Krankheitsverlauf der CED eingreifen. So führt beispielsweise das Ausschalten von Dicer 1, einem Syntheseprotein für die Herstellung von miR, im Mausmodell zu einer CED-ähnlichen Darmerkrankung (Cichon, Sabharwal, Rüter, & Schmidt, 2014), (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017). Außerdem konnten diverse Forschungsarbeiten zeigen, dass die Expressionsmuster bestimmter miRs bei entzündlichen Darmerkrankungen verändert sind (Cichon, Sabharwal, Rüter, & Schmidt, 2014).

In dieser Arbeit sollen die Expressionsprofile von miR-155 und miR-146a in der humanen Kolonmukosa von MC- und CU-Patienten untersucht werden.

miR-155 ist eine hochkonservierte miR (Tam, 2001) und wird in der Literatur als proinflammatorischer Marker beschrieben, wobei inflammatorische Stimuli wie der TNF- α oder Interleukin-1-beta (IL-1 β) deren Expression erhöhen (Mahesh & Biswas, 2019). Außerdem zeigten Versuche mit intestinalen Zytokin-stimulierten HT29-Kolonkarzinomzellen, dass miR-155 an der Herunterregulation des Forkhead box Proteins O3a (FOXO3a) - Signalwegs beteiligt ist. FOXO3a wirkt anti-inflammatorisch und miR-155 scheint somit an der Promotion der Inflammationen beteiligt zu sein (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017), (Cao, et al., 2017).

Im Gegensatz zu miR-155 besitzt miR-146a möglicherweise anti-inflammatorische Eigenschaften. miR-146a wird u.a. durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 β und TNF- α induziert und reguliert im Menschen über einen negativen Feedback-loop die Inflammation herunter. Umgekehrt führt eine anti-TNF- α -Therapie bei erkrankten CU-Patienten zu einer Reduktion von miR-146a (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017). Im Mausmodell mit induzierter intestinaler Ischämie führt u.a. der Entzündungsmediator IL-1-rezeptorassoziierte Kinase 1 (IRAK1) zu Entzündungsreaktionen in der ischämischen Darmmukosa. Durch Induktion von miR-146a in vivo konnte die IRAK1-Expression herunterreguliert werden und negative Effekte der Ischämie abgemildert werden, was für protektive Eigenschaften von miR-146a spricht (Runtsch, Round, & O'Connell, 2014). Ferner wurde beobachtet, dass miR-146a-defiziente Mäuse Entzündungssymptome entwickelten, die denen bei CED ähnlich waren. (Mahesh & Biswas, 2019). Daher wird angenommen, dass miR-146a an der Pathogenese der CED beteiligt sein könnte (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017). Sowohl für CU als auch für MC wurden bereits Expressionsanalysen an humanem Gewebe bezüglich der miR-146a- und miR-155-Expression durchgeführt. Es konnte eine gesteigerte Expression beider miRs in entzündeten Darmabschnitten festgestellt werden, wohingegen die Expression in makroskopisch und histologisch unauffälligen Darmabschnitten nicht gesteigert war (Béres, et al., 2016), (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017).

Aufgrund der antiinflammatorischen Eigenschaften von miR-146a wird auch ein Einfluss auf die intestinale Barrierefunktion vermutet (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017). Denn im miR-146a-knockout Mausmodell, wird eine spontane Inflammation im Darm von Mäusen beobachtet (Runtsch, et al., 2015). Daher wurde vermutet, dass miR-146a auch eine Herunterregulation von Proteinen/Genen der Epithelbarriere bewirken könnte. Dies könnte die Epithelbarriere durchlässiger und die Mäuse anfälliger für luminale Pathogene und Antigene machen (Anzola, et al., 2018), (Runtsch, et al., 2015).

Durch bioinformatische Verfahren können Rückschlüsse darauf gezogen werden, welche Proteine von einer miR in ihrer Expression potentiell beeinflusst werden. Für einige miRs, wie beispielsweise miR-155, werden Zielgene prognostiziert, die am Aufbau des TJ-Komplexes beteiligt sind (Pan, et al., 2019), (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017). Es scheint daher plausibel, dass miRs direkt am Krankheitsprozess der CED beteiligt sind und einen regulatorischen Einfluss auf die Integrität der Epithelbarriere haben könnten.

2. Fragestellung

In dieser klinisch-experimentellen Forschungsarbeit soll der Einfluss von miR-155 und miR-146a auf den Krankheitsprozess von MC und CU untersucht werden. miRs können durch Bindung an mRNA die Translation von Proteinen beeinflussen, dadurch als positive oder negative Feedback-Regulatoren der Proteinexpression fungieren und somit in biologische Prozesse eingreifen. Daher soll in einem ersten Schritt dieser Arbeit das Expressionsprofil von miR-155 und -146a in der humanen Kolonmukosa von MC- und CU-Patienten in entzündeten und nicht-entzündeten Arealen bestimmt und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Wir vermuten, dass Expressionsunterschiede zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Arealen sowie zwischen entzündeten Arealen und gesunden Kontrollen vorliegen könnten, da die beiden miRs entzündungsabhängig exprimiert werden.

Die klinischen Symptome bei CED sind vielfältig, viele davon werden mit einer veränderten Darmbarriere durch gestörte Zell-Zell-Kontakte im Epithel des Darmes in Verbindung gebracht. Außerdem wird vermutet, dass Immunzellen des Darmes aufgrund der gestörten Darmbarriere verstärkt luminalen Antigenen ausgesetzt sind, was eine Inflammation auslösen oder verschlimmern kann. Um den Einfluss obiger miR auf das Darmepithel zu untersuchen, sollen in einem zweiten Teil dieser Arbeit, miR-155- und miR-146a-Überexpressionsklone untersucht werden. Über die Messungen des transepithelialen Widerstandes eines aus diesen Klonen kultivierten Zellmonolayers und Expressionsanalyse von barrierelevanten TJ-Proteinen (CLDN-1 und 2) sollen Rückschlüsse über den direkten Einfluss der miRs auf die Darmbarriere gezogen werden. Wir vermuten, dass eine Überexpression von miR-155 und miR-146a, die in der Literatur als inflammatorisch regulierte Marker beschrieben werden, die Barriereintegrität reduzieren könnten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen zum tieferen Verständnis der Pathogenese der CED beitragen und auf diese Weise die Entwicklung neuer therapeutischer Behandlungskonzepte ermöglichen.

3. Ethik

Für diese Forschungsarbeit wurden prospektiv notwendige Patientendaten erhoben, Kolonmukosa dieser Patienten laborchemisch verarbeitet und die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet. In Einklang mit der Berufsordnung für Ärztinnen und Ärzte wurde vor der Durchführung dieser biomedizinischen Forschung und der epidemiologischen Datenerhebung eine Ethik-Kommission zu berufsethischen und – rechtlichen Fragen konsultiert. In der ursprünglichen Fassung bewilligte die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin die Probenentnahme aus Operationsresektaten. Diese Bewilligung wurde in einer zweiten Fassung ergänzt, um auch Koloskopie-Biopsien beziehen zu können. Alle Patienten wurden rechtzeitig jeweils über Studienziele, datenschutzrechtliche Bestimmungen sowie mögliche Risiken aufgeklärt und eine schriftliche Patienteninformation ausgehändigt. Die schriftliche Zustimmung durch die Patienten war Voraussetzung für die Studienteilnahme. Ein Widerruf war jederzeit und ohne Angaben von Gründen möglich. Kein Studienproband nahm von diesem Recht Gebrauch. Die Patientendaten wurden anonymisiert.

4. Material und Methoden

4.1. Geräte und Materialien

Tabelle 1: Geräte.

Geräte:	Hersteller und Firmensitz:
Millicell Probe-Set ERS-2 Epithelial Volt-Ohm-Meter	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Brutschränke	
- Heracell CO ₂ -Inkubator	- ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
- Wärmeschrank BB 15 CO ₂ -Incubator 37 °C	- ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1mm Fläche 0,0025 mm ²)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Präzisionswaagen	
- Practum 1102-1S	- Sartorius Lab Instruments, Göttingen, Deutschland
- VWR LA 214i	- VWR, Radnor (DE), USA
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen	
- Biofuge primoR Heraeus mit Kühlung	- ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
- Eppendorf Centrifuge 5415 D	- Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EL808 Ultra Microplate Reader + Mikrotiterplatten + Software KC4 Kineticalc for Windows Version 2.7 Rev. 8	BioTek Instruments Inc., Winooski (VT), USA
Gießstand und Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3 Cell	BioRad, Hercules (CA), USA
Elektrotransfersystem Mini-Transblot-Zelle	BioRad, Hercules (CA), USA

Tabelle 1: Geräte (Fortsetzung).

Geräte:	Hersteller und Firmensitz:
Netzgerät Power PAC 1000	BioRad, Hercules (CA), USA
Vilber Lourmat (LAS 1000)	Vilber, Eberhardzell, Deutschland
Chemolumineszenzdetektor + Software FusionCapt Advance 16.15	
Magnetrührer TMC 2071 Assistent mit Rührstäbchen	CAT M. Zipperer GmbH, Ballrechten- Dottingen, Deutschland
Gefrierschrank Hera freeze (-80°C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop 2000	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Laboratory Medical Centrifuge LMC- 3000	bioSan Medical-Biological Research & Technologies, Riga, Lettland
7500 Fast Real-Time PCR System + Software Sequence Detection Version 1.4.0.25	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia (NY), USA
Laborkühlschrank	Kirsch Medical, Willstätt, Deutschland
Schüttelinkubator Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Semidry Transblotzelle Turbo Transfer System	BioRad, Hercules (CA), USA

Tabelle 2: Verbrauchsmaterial.

Material:	Hersteller und Firmensitz:
FALCON 250ml Zellkulturflasche mit schrägem Hals	Corning Inc., Corning (NY), USA
Millicell PCF-Zellkulturfilter (3 µm Porengröße, 12mm Durchmesser)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Tissue culture dish 100x20 mm	Sarstedt AG und Co. KG, Rheinbach, Deutschland
96-Well-Platte	Sarstedt AG und Co. KG, Rheinbach, Deutschland
MicroAmp Optical Adhesive Film PCR-Compatible, DNA/RNA/RNase Free für 96-Well-Platte	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
Rührspatel aus Plastik	
Microtube 2ml mit Schraubdeckel	Sarstedt AG und Co. KG, Rheinbach, Deutschland
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode (0.1mL) + Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
Biosphere® Filter Tips verschiedener Größen	Sarstedt AG und Co. KG, Rheinbach, Deutschland
Mikroreaktionsgefäße autoklaviert	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Stabpipetten verschiedener Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einmalpistille (Plastik)	BioRad, Hercules (CA), USA

Tabelle 3: Gebrauchsfertige Kits/Lösungen.

Kit/Lösung:	Hersteller und Firmensitz:
Pierce™ BCA Protein Assay Kit mit Reagenz A, B und BSA-Standardlösung	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
PageRuler™ Plus vorgefärbte Proteinleiter (10 – 250 kDa)	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
LumiLight Western Blotting Substrate	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific Baltics, Vilnius, Litauen
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
TaqMan® Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
Gibco DPBS (1X) Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Acid Phenol:CHCl ₃ 5:1 Solution pH 4.5 +/-0.2 (125:24:1 Mischung auf Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol)	Ambion® ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA
Ethanol ≥ 99,8%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasser Nuclease-frei, steril und autoklaviert, DEPC-behandelt	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 4: Zelllinien.

Zelllinie:	Beschreibung:	Herkunft:
HT-29/B6	humane Kolonkarzinomzelllinie Klon B6	Institut für klinische Physiologie, Charité Berlin
HT-29/B6-miR 146a	miR-146a- Überexpressionsklon	Chirurgisches Forschungslabor, Charité Berlin
HT-29/B6-miR 155	miR-155-Überexpressionsklon	Chirurgisches Forschungslabor, Charité Berlin

Tabelle 5: Antikörper.

Antikörper:	Spezies:	Hersteller und Firmensitz:
Claudin-1	Kaninchen	Zymed Laboratories, Waltham (MA), USA
Claudin-2	Kaninchen	Zymed Laboratories, Waltham (MA), USA
β -Aktin	Maus	Zymed Laboratories, Waltham (MA), USA
HRP-konjugierter-anti- Maus IgG (Alexa Fluor 488)	Ziege	Invitrogen, Waltham (MA), USA
HRP-konjugierter-anti- Kaninchen IgG (Alexa Fluor 488)	Ziege	Invitrogen, Waltham (MA), USA

Tabelle 6: Primer/Sonden.

Primer/Sonden:	Hersteller und Firmensitz:
TaqMan® MicroRNA Assay RT-Primer	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
- has-miR-146a 150µl 5X	
- has-miR-155 150µl 5X	
- RNU6B 150µl 5X	
TaqMan® MicroRNA Assay Sonden	Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
- has-miR-146a 150µl 20X	
- has-miR-155-5p 150µl 20X	
- RNU6B 150µl 20X	

Tabelle 7: Mastermixe.

Mastermix	Menge	Einheit	Reagenz
RT-Mastermix je miR	0,15	µl	100mM dNTPs
und Probe	1	µl	Reverse Transkriptase (50U/µL)
	1,5	µl	10x RT-Buffer
	0,19	µl	RNase-Inhibitor (20U/µL)
	4,16	µl	H ₂ O (nukleasefrei)
qRT-PCR-Mastermix	10	µl	2x Mix (TaqMan® Universal PCR Master Mix)
je miR und Probe	7	µl	H ₂ O (nukleasefrei)

Tabelle 8: Zellkulturmedium Zusätze.

Zellkulturmedium Zusatz:	Hersteller und Firmensitz:
RPMI 1640 1x mit L-Glutamin 500mL	Corning Inc., Corning (NY), USA
Penicillin 10000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Gibco FBS (fetal bovine serum)	ThermoFisher Scientific, Waltham (MA), USA

Tabelle 9: Puffer.

Puffer:	Menge:	Einheit:	Reagenz:
Lysepuffer	10	mM	Tris-Cl pH 7,5
	150	mM	NaCl
	0,5	%	Triton X-100
	0,1	%	SDS
	1:100		Protease-Inhibitor-Cocktail
Je Trenngel (PAA-Konzentration: 12,5%)	3,75	ml	H ₂ O (nukleasefrei)
	2,4	ml	1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8
	3,1	ml	PAA (Polyacrylamidlösung) 40%
			Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung
	50	µl	SDS 10%
	50	µl	APS 10%
	5	µl	Temed (Tetramethylethylenediamine)
Je Sammelgel (PAA-Konzentration: 5%)	3,1	ml	H ₂ O (nukleasefrei)
	1,25	ml	0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8
	0,5	ml	PAA (Polyacrylamidlösung) 40%
			Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung
	50	µl	SDS 10%
	50	µl	APS 10%
	5	µl	Temed (Tetramethylethylenediamine)
Tris-Glycin-Puffer (=5x Laemmli)	0,32	M	Tris pH 6,8
	44	%	Glycerol
	25	%	Merkaptoethanol
	12,5	%	SDS
	0,001	%	Bromphenolblau
Gelelektrophoresepuffer	890	ml	H ₂ O (nukleasefrei)
	100	ml	10x Puffer West
	10	ml	SDS 10%

Tabelle 9: Puffer (Fortsetzung).

Puffer:	Menge:	Einheit:	Reagenz:
10x Puffer West	1	l	H ₂ O (nukleasefrei)
	144	g	Glycin
	30,4	g	Tris
Transferpuffer	1	l	H ₂ O (nukleasefrei)
	100	ml	10x Puffer West
	100	ml	Methanol
TBS/T	900	ml	H ₂ O (nukleasefrei)
	1	ml	Tween
	100	ml	TBS (10x)
TBS (10x)	9,5	l	H ₂ O (nukleasefrei)
	800	g	NaCl (1,37 M)
	121	g	TRIS
	HCl	bis pH 7,3	
Blockier-Lösung 1. Ak	50	ml	TBS/T
	5	%	BSA (bovines Serumalbumin)
	0,02	%	NaAzid
Blockier-Lösung 2. Ak	50	ml	TBS/T
	5	%	Magermilchpulver
Tris	5	l	H ₂ O (nukleasefrei)
	34	g	Tris-HCl
	4,5	g	Tris-Base
	44	g	NaCl
	5	ml	Tween

4.2. Humanproben

Humane Kolonmukosa wurde aus Operationsresektaten und aus Koloskopie-Biopsaten von CU- und MC-Patienten bezogen. Dies geschah nach Zustimmung durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin, Aufklärung und schriftlicher Zustimmung durch die Studienprobanden präoperativ. Der Entzündungsstatus der Kolonmukosa wurde durch Pathologen oder Endoskopiker anhand morphologischer Gesichtspunkte beurteilt und Gewebeanteile aus entzündeten und nicht-entzündeten Arealen entnommen. Abbildung 3 zeigt exemplarisch das morphologische Erscheinungsbild der Kolonmukosa eines eröffneten Kolonresektats eines CU-Patienten. Zum Vergleich wurde gesunde Kolonmukosa aus dem Randbereich von resezierten Kolonkarzinomresektaten bezogen und als Kontrollkollektiv benutzt. Auch dies geschah in enger Absprache mit den Pathologen vor Ort.

Die Lagerung der Proben erfolgte in Microtubes bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die nativen Biopsate wurden zuvor im Microtube durch flüssigen Stickstoff ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) kryokonserviert. Die Operationsresektate wurden ebenfalls in Microtubes kryokonserviert, jedoch aufgrund ihrer Größe zuvor mit einem Skalpell zerkleinert und Nichtmukosaanteile entfernt. Während des Transports und der Verarbeitung wurden die Proben bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt.

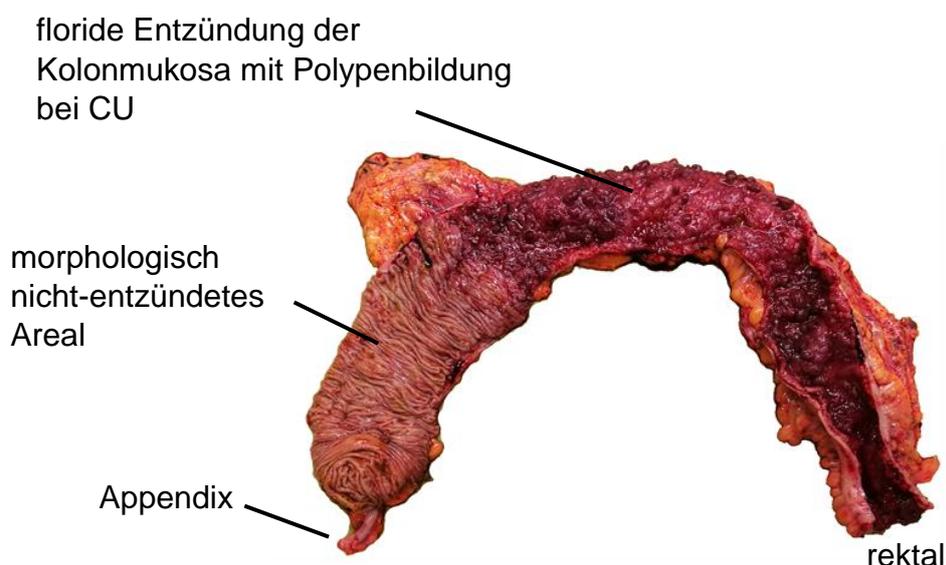


Abbildung 3: Kolonpräparat eines CU-Patienten. Kolon eröffnet entlang der Taenia libera. Blick auf die Kolonmukosa. Erkennbar ist ein appendixnaher, morphologisch nicht-entzündetes Areal, das in ein Areal mit florider Entzündung übergeht.

4.3. miR-Extraktion

Die Isolation der miR aus dem Mukosagewebe erfolgte mit dem gebrauchsfertigen mirVana™ microRNA Isolations-Kit gemäß Herstellerangaben (Thermo Fisher Scientific, 2018).

Die Proben wurden in ein Eppendorfgefäß überführt, ein gewichtadaptiertes Volumen des Kit-Lysepuffers zugegeben (1 mL Lyse/Binding-Puffer pro 0,1 g Gewebe) und die Proben mittels Pistille händisch lysiert. Anschließend wurde das Lysat durch ein weiteres Reagenz homogenisiert (1 µL Homogenate Additive pro 10 µL zugegebenem Lyse/Binding-Puffer). Das Homogenisat wurde für 10 Minuten (min) auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe einer Phenolsäure-Chloroformlösung (gleiches Volumen wie Lyse/Binding-Puffer; 125:24 = Phenol:Chloroform) und Zentrifugation für 5 min bei 1000 Umdrehungen pro min (rpm). Der wasserklare Überstand des Zentrifugates mit der enthaltenen miR wurde mittels Pipette in ein neues Eppendorfgefäß überführt und dabei dessen Volumen bestimmt. Ethanol (100%) wurde zugegeben, bis eine Gesamt-Ethanolkonzentration von 25 Vol. % erreicht war. Die Gesamtlösung wurde für 15 Sekunden bei 1000 rpm durch einen Glasfaserfilter in ein RNase-freies Eppendorfgefäß zentrifugiert und dadurch große RNAs herausgefiltert. Die miR passierte den Filter. Die Ethanolkonzentration des Zentrifugates wurde auf 50 Vol. % angehoben und die Lösung erneut für 15 Sekunden bei 1000 rpm durch einen neuen Glasfaserfilter zentrifugiert. Die miR immobilisierte dabei auf dem Filter. Durch 3 Waschvorgänge des Filters mit Waschlösungen des Kits wurde die miR aufgereinigt. Die gebundene miR wurde durch 100 µl eines 95 °C heißen Elutionspuffers und Zentrifugation (20 Sekunden bei 1000 rpm) eluiert.

Die Konzentration der eluierten miR wurde mittels NanoDrop-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Lagerung der eluierten miR erfolgte bei -80 °C.

4.4. Reverse Transkription

Durch reverse Transkription (RT) wurde die miR äquimolar in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, um diese anschließend mittels Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) quantifizieren zu können. Bei der RT diente die miR als Vorlage (Template). An dieses Template banden komplementär spezifische Primer. Ausgehend von diesen Primern wurde durch ein retrovirales Enzym (reverse Transkriptase) durch Anlagerung von Nukleotiden (dNTPs) die cDNA synthetisiert.

Für die RT wurde das TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Das Vorgehen folgte den Angaben des Herstellers (ThermoFisher Scientific, 2020).

Die eluierte miR wurde mit nukleasefreiem Wasser auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Die korrekte Verdünnung wurde mittels NanoDrop-Messung überprüft. Je Probe wurden drei RNAs (miR-146a, miR-155, sn-rnu6B) in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden pro Probe drei Eppendorfgefäße mit je 7 µl Mastermix, 10 ng miR und 3µl spezifischem 5xRT-Primer versetzt und das Gesamtvolumen mit nukleasefreiem Wasser (H₂O) auf 15 µl angehoben. Kontinuierliche Kühlung auf Eis verhinderte den enzymatischen miR-Abbau. Die Eppendorfgefäße wurden in den Thermocycler eingesetzt und der Temperaturzyklus gemäß Tabelle 10 eingestellt. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 10: Temperaturzyklus des RT-Thermocyclers.

Zeitdauer [min]:	Temperatur [°C]:	Beschreibung:
30	16	Anlagerung der Primer.
30	42	Reverse Transkription durch dNTP-Anlagerung an Primer.
5	85	Denaturierung der reversen Transkriptase.
Hold	4	Haltetemperatur bis Probenentnahme.

4.5. Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die cDNA-Konzentration wurde mit der qRT-PCR bestimmt. Bei diesem Verfahren wird die cDNA in sich wiederholenden Zyklen komplementär verdoppelt und bei jeder Verdopplung ein Fluorophor freigesetzt. Die Fluoreszenzintensität wird nach jedem Zyklus gemessen und korreliert mit der initial enthaltenen cDNA-Konzentration (ThermoFisher Scientific, 2020).

In je ein Well einer 96-Well-Platte wurden 2 µl der cDNA, 17 µl qRT-PCR-Mastermix und 1 µl einer miR-spezifischen TaqMan® MicroRNA Assay Sonde pipettiert. Der Mastermix enthielt die Polymerase sowie die Nukleinsäuren zur Strangsynthetisierung. Jede Probe wurde doppelt prozessiert. Die 96-Well-Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen, zentrifugiert (10 Sekunden) und in den qRT-PCR-Cycler eingesetzt. Der Temperaturzyklus des Cyclers wurde gemäß Tabelle 11 eingestellt und insgesamt 45 mal durchlaufen.

Tabelle 11: Temperaturzyklus des qRT-PCR-Cyclers.

Zyklen:	Zeitdauer [min]:	Temperatur [°C]:	Beschreibung:
1	10	95	Initialisierung.
45	0:15	95	Trennung komplementärer DNA-Stränge.
	1	60	DNA-Synthese durch Polymerase.

Die PCR läuft in 3 Phasen ab (Yuan, Reed, Chen, & Stewart Jr, 2006): Initial wird die DNA mit jedem Zyklus verdoppelt (exponentielle Phase), die gemessene Fluoreszenz steigt exponentiell an. Die exponentielle Phase geht in die lineare Phase über, sobald alle Polymerase-Enzyme gesättigt sind oder Substratmangel eintritt, die Fluoreszenzintensität steigt linear an. Es folgt die Plateauphase durch thermische Zerstörung der Enzyme und Substratverbrauch. In der exponentiellen Phase ist die Ausgangsmenge an DNA proportional zur Fluoreszenzintensität. Die Zyklusnummer, bei der die exponentielle in die lineare Phase übergeht, wird als Threshold-Counterwert C_t bezeichnet und vom Kontrollprogramm des qRT-PCR-Cyclers ausgegeben (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, 2020). Der C_t -Wert ermöglicht den Vergleich der DNA-Konzentrationen, da er umso kleiner ist, je mehr DNA initial enthalten war (Abbildung 4).

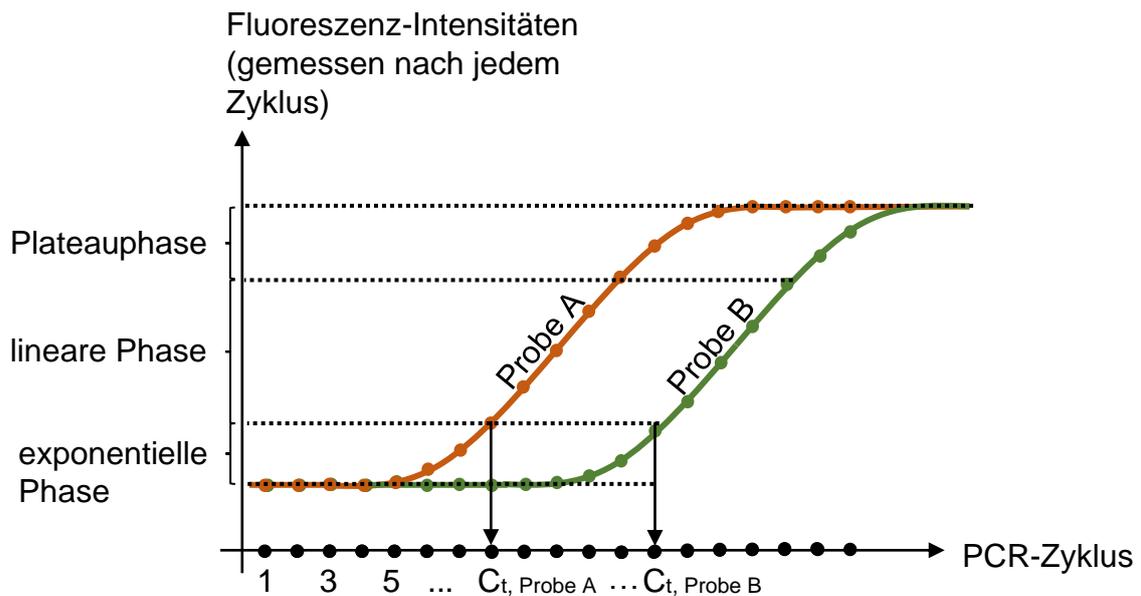


Abbildung 4: Vergleich der C_t -Werte von 2 Proben. In Probe A, in der die cDNA verstärkt exprimiert wird, wird der Treshhold-Wert C_t früher überschritten als bei Probe B.

4.6. Auswertung der miR-Expressionslevel mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Der Vergleich der C_t -Werte der Kollektive (entzündete Areale jeweils von CU und MC, nicht-entzündete Areale jeweils von MC und CU, Kontrolle) erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2016 und der vergleichenden $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Bei dieser Methode wird der relative Unterschied der miR-Expression zwischen den Kollektiven durch Normierung auf eine Housekeeping-Referenz bestimmt. Vorteilhaft ist bei dieser Methode, dass sich Prozessierungsungenauigkeiten und Fehler in miR-Isolation, RT und qRT-PCR in gleicher Weise auf alle RNAs auswirken und sich deshalb nach Normierung auf eine interne Housekeeping-Referenz die relativen Expressionsunterschiede nicht ändern (Absolute und relative Quantifizierung für die qPCR im Vergleich, 2019). Als Housekeeping-Referenz diente in dieser Arbeit die small nuclear RNA (snRNA) rnu6B (sn-rnu6B).

Gemäß (Livak & Schmittgen, 2001) errechnet sich das Expressionsvielfache der miR-Konzentrationen zwischen den erkrankten Kollektiven und Kontrollkollektiv gemäß Formel (1):

$$\Delta C_{t,\text{erkranktes Kollektiv}} = \frac{\sum C_{t,\text{miR,erkrankt}} - C_{t,\text{sn-rnu6B,erkrankt}}}{\text{Anzahl Proben im Kollektiv}}$$

$$\Delta C_{t,\text{Kontrollkollektiv}} = \frac{\sum (C_{t,\text{miR,Kontrolle}} - C_{t,\text{sn-rnu6B,Kontrolle}})}{\text{Anzahl Proben im Kontrollkollektiv}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t,\text{erkranktes Kollektiv}} - \Delta C_{t,\text{Kontrollkollektiv}}$$

Expressionsvielfaches = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (1)
--

Die Schwankungsbreite (SB) wird für jedes Kollektiv berechnet gemäß Formel (2) (Livak & Schmittgen, 2001).

$$\text{Standardfehler} = \frac{\text{Standardabweichung der } \Delta C_t \text{ eines Kollektivs}}{\sqrt{\text{Anzahl an Proben im Kollektiv}}}$$

$SB =$ $[\text{Expressionsvielfaches} * 2^{-\text{Standardfehler}};$ $\text{Expressionsvielfaches} * 2^{\text{Standardfehler}}]$	(2)
--	-----

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden in Form von Balkendiagrammen als Vielfaches der Kontrolle mit Schwankungsbreite angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden in Rücksprache mit einer Statistikerin der Charité Universitätsmedizin Berlin mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben bestimmt. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, sofern der Signifikanzwert $p < 0,05$ war (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.7. Zellkultur aus miR-Überexpressionsklonen

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnten HT-29/B6-miR-Überexpressionsklone benutzt werden. HT-29/B6 entspringt einer humanen Kolonkarzinomzelllinie und eignet sich aufgrund seiner Eigenschaft, konfluente Monolayer auszubilden, für die durchzuführenden Analysen (Kreusel, Fromm, Schulzke, & Hegel, 1991). Die Überexpressionsklone wurden durch lentivirale Transduktion erzeugt und exprimierten gegenüber der Vektorkontrolle die miR-146a 40- beziehungsweise die miR-155 35-fach.

Die Klone wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 95 % Raumluft in T25-Zellkulturflaschen im Begasungsbrutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde RPMI verwendet, dem 10 % fetales Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin beigelegt war. Das Medium wurde 2-tägig erneuert. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellmonolayers wurde mit PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA bei 37 °C enzymatisch vom Flaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem RPMI und wiederholtem Pipettieren wurden die Zellen vereinzelt. 10 µl dieser Zellsuspension wurden verwendet, um mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl lichtmikroskopisch zu bestimmen. Eine identische Anzahl an Zellen ($2,5 \cdot 10^6$ Zellen) jedes Klons wurden auf je einen Millicell-PCF-Zellkulturfilter mit einer Fläche von 0,6 cm² und einer Porengröße von 3 µm ausgesät. Die Kultivierung der Filter erfolgte auf Zellkulturschalen für 7 Tage bei 37 °C im Brutschrank, die Zellkulturfilter wurden mit 500 µl, die Zellkulturschale mit 10 ml Zellkulturmedium befüllt. Es bildete sich eine konfluenter, differenzierter und polarisierter epithelialer Zellmonolayer mit interzellulären TJ und apikalem Bürstensaum auf den Zellkulturfiltern aus (Kreusel, Fromm, Schulzke, & Hegel, 1991).

4.8. Messung des transepithelialen Widerstandes (TER)

Der transepitheliale Widerstand (TER) eines Zellmonolayers ist ein Maß für die epitheliale Barriereintegrität. Er setzt sich aus zwei Anteilen zusammen, dem transzellulären und dem parazellulären Widerstand. Der transzelluläre Widerstand ergibt sich als Summe aller elektrischen Widerstände der einzelnen Zellen. Der parazelluläre Widerstand beschreibt den Widerstand, der durch Limitation des Ionentransportes zwischen den Zellen entsteht. Wird die Durchlässigkeit zwischen den Zellen für Ionen höher, so sinkt der parazelluläre Widerstand, da Ionen leichter wandern können.

Der TER über dem Zellmonolayer wurde mithilfe eines Chopstickelektrodenpaares und eines Ohmmeters (Abbildung 5) unter standardisierten Bedingungen bestimmt. Die Elektroden wurden vor jeder Messung mit 80% Ethanol gereinigt, um eine Kontamination der Kulturen zu vermeiden.

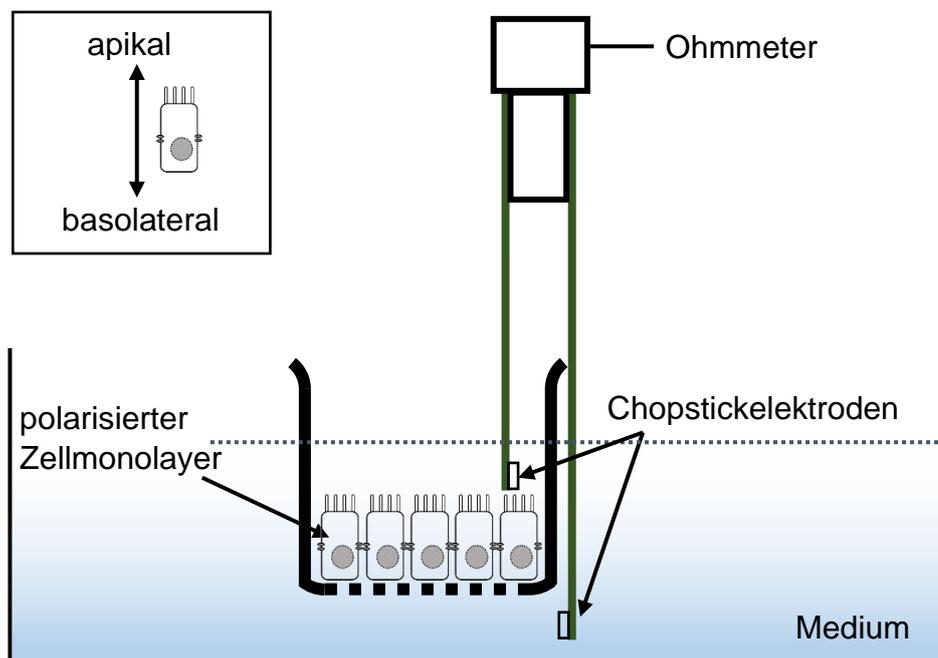


Abbildung 5: TER-Messung. Schematische Darstellung der Messung des elektrischen Widerstands über dem Zellmonolayer mithilfe zweier Chopstickelektroden, die apikal und basolateral des Layers platziert wurden. Der Monolayer befand sich in einem Filterinsert, welches in einer mit Medium gefüllten Zellschale platziert wurde.

4.9. Proteinextraktion und –quantifizierung

Um die in den Zellen des konfluenten Monolayers enthaltenen Proteine zu analysieren, wurden die Filter 3x mit PBS gewaschen, anschließend wurden 150 µl eiskalter Lysepuffer auf den Zellmonolayer gegeben und die Zellen händisch mithilfe eines Rührspatels vollständig vom Filterboden abgelöst. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und dieses für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4 °C und 13000 x g für 10 min pelletierten dichtere Zellbestandteile. Der Überstand mit den enthaltenen Proteinen wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Das Pellet wurde verworfen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration aus dem Überstand erfolgte nach dem Auftauen kalorimetrisch mittels BCA (Bicinchonsäure)-Proteinassay. Hierbei reduzieren die Proteine zugegebene Cu(II)- zu Cu(I)-Ionen. Diese Cu(I)-Ionen bilden mit BCA einen violettfarbenen Chelatkomplex, der bei 562 nm ein spektralphotometrisches Absorptionsmaximum aufweist (Serva.de, 2020). Die photometrisch bei 550 nm gemessene optische Dichte der Lösung korreliert mit der Menge an entstandenem Farbstoff beziehungsweise Proteinanteil in der Lösung (Spektrum.de, 2020). Mithilfe eines parallel prozessierten bovinen Serumalbumin–Standards (BSA) wurde durch lineare Regression eine Eichgerade erstellt und damit die zu analysierenden Proteinkonzentrationen mathematisch errechnet.

Das praktische Vorgehen folgte den Herstellerangaben (ThermoFisher, 2020): Es wurden jeweils 10µl je Standard (Konzentrationen 0, 0.2, 0.8 und 1.2 mg BSA/ml) bzw. 10 µl Probe zusammen mit 190 µl Gebrauchslösung in Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Proben wurden zuvor 1:5 mit PBS verdünnt, die Gebrauchslösung aus 196 µl Reagenzlösung A und 4 µl Reagenzlösung B des Assaykits hergestellt. Proben und Standards wurden jeweils doppelt aufgetragen. Die 96-Well-Platte wurde dann für 30 min bei 37 °C inkubiert. Dabei fand die oben beschriebene Chelatkomplex-Farbstoffbildung statt. Die spektralphotometrische Messung erfolgte direkt im Anschluss. Die Werte der Doppelbestimmungen wurden gemittelt.

4.10. Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese

Die Proteine der Zellysate wurden mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einer Gelmatrix nach Molekülgrößen aufgetrennt.

Bei diesem Elektrophoreseverfahren bildet das zum Proteingemisch zugegebene, negativ geladene Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) mit den Proteinen negativ geladene Komplexe, die in einer Polyacrylamid-Gelmatrix einem elektrischen Feld ausgesetzt werden und zum Pluspol (Anode) wandern. Aufgrund ihrer geringeren Mobilität werden größere Komplexe durch die Gelmatrix stärker zurückgehalten und wandern langsamer, so kommt es zu einer Auftrennung der SDS-Proteinkomplexe nach deren Molekulargewicht. Das SDS wird verwendet, um die Eigenladung der Proteine abzuschirmen, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit unabhängiger von der Proteineigenladung und hauptsächlich abhängig vom Molekulargewicht wird (Elektrophorese, 2020). Ein ebenfalls aufgetrenntes Gemisch mit Molekülen bekannten Molekulargewichts (Marker) ermöglicht die Identifizierung einzelner Proteine.

Für die Gelherstellung und Elektrophorese wurden Gießstände und das Elektrophoresesystem Mini-Protean® 3 Cell der Firma BioRad verwendet. Die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgte mittels den im Materialteil angegebenen Chemikalien und Mengenangaben unter dem Abzug bei Raumtemperatur, wobei TEMED und APS als Katalysatoren dienten und als letztes zugegeben wurden. Das Trenngel mit einer Polyacrylamid- (PAA) Konzentration von 12,5% und einem pH-Wert von 8,8 wurde zwischen zwei in einem Gießstand fixierte Glasplatten gegossen und mit reinem Alkohol überschichtet. Nach der Aushärtung wurde der Alkohol entfernt. Auf das Trenngel wurde ein Sammelgel mit einer PAA-Konzentration von 5% und einem pH von 6,8 gegossen. Durch die schnellere Laufgeschwindigkeit der Proteine im Sammelgel wird eine Konzentrierung der Proteine an der Lauffront zwischen Trenn- und Sammelgel erreicht. Durch einen Probenkamm wurden Taschen im Sammelgel geformt, in die später die Proben geladen werden konnten. Nach der Aushärtung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt.

Als nächstes wurden die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet. In der hier verwendeten SDS-PAGE wurden die Proteine mit einem blauen Tris-Glycin-Puffer (=Laemmli-Puffer; enthält SDS) versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt. Die blaue

Farbe diente der Identifizierung der Laufstrecke der Proteine. Durch das Erhitzen denaturierten die Proteine und das SDS band an die Proteine.

Die hergestellten Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit Elektrophoresepuffer gefüllt und die Taschen des Elektrophoresegels mit jeweils 20 µg der aufbereiteten Protein-Gemische in einem Volumen von 20 µl beladen. Ferner wurde eine Tasche mit 6 µl Marker beladen. Der Marker bestand aus Proteinen mit Molekulargewichten von 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 und 250 kDa. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (100 Volt) durchgeführt und beendet, sobald die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit aufgrund des unterschiedlichen Molekulargewichts wurden die Proteingemische aufgetrennt, eine Proteinidentifizierung war durch Vergleich mit dem Marker möglich (Abbildung 6).

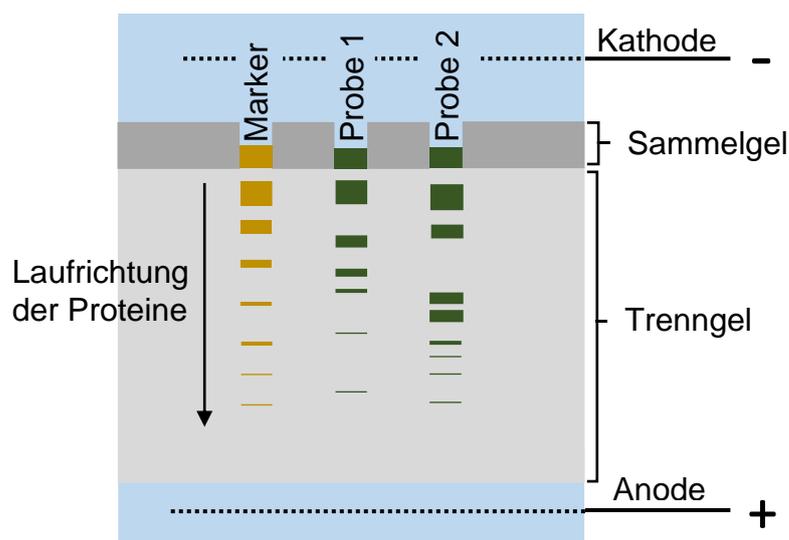
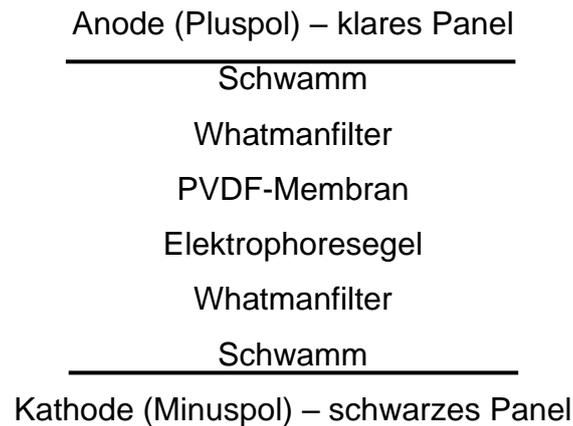


Abbildung 6: Prinzip der Gelelektrophorese. Die zwischen zwei Glasplatten eingespannten Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Proben wurden in die Taschen des Sammelgels geladen und eine elektrische Spannung von 100 Volt angelegt. Der Gelelektrophoresepuffer stellt eine elektrisch leitende Verbindung zwischen Gel und Elektroden her. Durch das elektrische Feld kommt es zu einer Auftrennung der Proteine nach der Molekülgröße, da größere Moleküle langsamer wandern. Ein Marker mit Molekülen bekannter Größe ermöglichte die Identifizierung unbekannter Proteine aus den Proben.

4.11. Western Blot und Immundetektion

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden durch Western Blot mittels eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes vom Gel gelöst und auf eine PVDF-Membran übertragen, auf der sie immunologisch nachgewiesen werden konnten.

Es wurde mit dem Tankblot-Verfahren gearbeitet. Beim Tankblot-Verfahren wurde ein Sandwich mit der Stapelreihenfolge



aufgebaut. Die PVDF-Membran musste zuvor für 5 min in reinem Alkohol aktiviert und alle Komponenten des Sandwiches in Transferpuffer äquilibriert werden. Luftblasen wurden mit einem Roller herausgestrichen. Das Sandwich wurde in eine Elektrodenkammer eingesetzt, ein Kühlakku eingesetzt und der Aufbau in Transferpuffer untergetaucht. Ein Magnetrührer rührte den Transferpuffer kontinuierlich für eine gleichmäßige Wärmeverteilung um. Der Transfer erfolgte bei 100 Volt für 1 Stunde.

Nach dem Elektrotransfer wurden die PVDF-Membranen 3-mal für je 10 min unter leichtem Schwenken mit TBS/T gespült und anschließend in einer 5%igen BSA-Blockierlösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler kontinuierliche geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren. Die Blockierlösung wurde verworfen, die Membran 3-mal je 10 min in TBST gewaschen und die Membranen über Nacht bei 4 °C unter kontinuierlicher Agitation mit einem primären Antikörper (Claudin-1 und 2 in Verdünnung 1:1000, β -Aktin in Verdünnung 1:5000), der BSA-TBST-Lösung gelöst war, inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen 3x für 10 min mit TBS/T gespült, und mit dem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:1000 in Milchpulver-TBS/T-Lösung) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschvorgängen je 10 min mit TBS/T erfolgte

die Inkubation in LumiLight-Lösung für die Chemolumineszenzreaktion. Die Lösung wurde gemäß Herstellerangaben im Verhältnis 1:1 aus Reagenz A und B des Kits angesetzt. Die PVDF-Membran wurde in dieser Lösung in einer lichtundurchlässigen Box für 5 min inkubiert und anschließend zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Es erfolgte die Detektion der Chemolumineszenz mit dem Chemolumineszenzdetektor LAS 1000 der Firma Vilber. Die Belichtungszeiten wurden manuell gewählt bis die gewünschten Banden sichtbar waren. Die untersuchten TJ-Proteine CLDN-1 und -2 besaßen ein Molekulargewicht von 20 kilo-Dalton (kDa), die β -Aktin-Referenz ein Molekulargewicht von 45 kDa (Cell Signaling Technology, 2020).

Die Proteine auf der PVDF-Membran wurden mittels Immundetektion detektiert. Bei diesem Verfahren binden primäre Antikörper spezifisch an die zu detektierenden Proteine. In dieser Arbeit waren dies Kaninchen CLDN-1- und CLDN-2 sowie Maus β -Aktin-Antikörper. An den primären Antikörper bindet in einem zweiten Schritt ein spezifischer sekundärer Antikörper, der das Reporterenzym Horseradish-Peroxidase (HRP) kovalent bindet. Dieses Rezeptorenzym katalysiert die Umwandlung eines zugefügten Chemolumineszenz-Farbstoffs (Luminol-Reaktion). Abbildung 7 verdeutlicht das Prinzip. Die Chemolumineszenz kann mit einem Detektor sichtbar gemacht werden und korreliert mit der auf der PVDF-Membran gebundenen Proteinmenge.

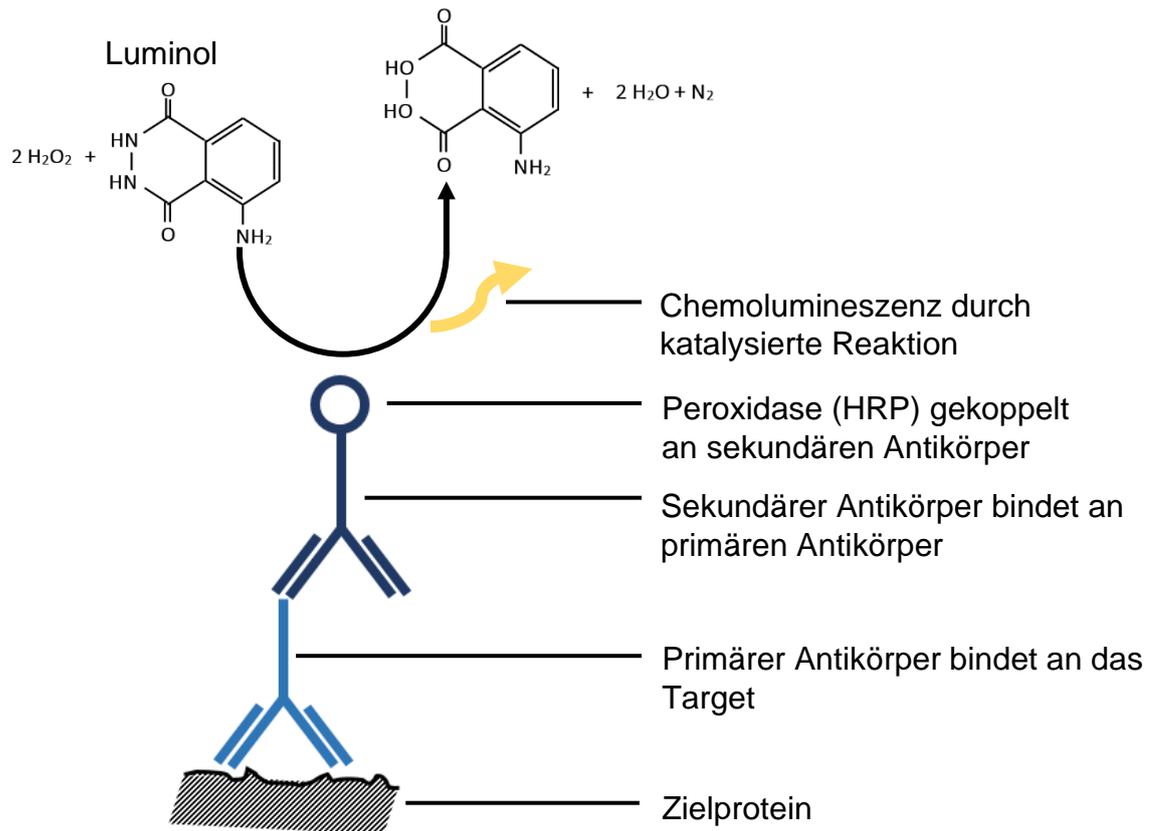


Abbildung 7: Prinzip der Immundetektion. Der primäre Antikörper bindet an das Zielprotein (Target). Ein zweiter Antikörper, an den eine Peroxidase gekoppelt ist, bindet an den primären Antikörper. Zugegebenes Luminol wird durch die Peroxidase reduziert. Dabei werden Photonen freigesetzt, die detektiert werden können. Die Intensität der Lumineszenz korreliert mit der Proteinkonzentration.

4.12. Auswertung der Zellkulturversuche

Die Widerstände aus den TER-Messungen wurden für jeden kultivierten Filter gemäß Formel (3) auf die Fläche der Filterinserts (0,6 cm²) und des Eigenwertes (132 Ω), der sich aus der Messanordnung, der Lösung und dem leeren Filterinsert bei 37 °C ergab, normiert.

$$\text{Normierter Widerstand} = \text{Fläche Filterinsert} * (\text{TER} - \text{Eigenwiderstand}) \quad (3)$$

Die normierten Widerstandswerte wurden jeweils für die Überexpressionsklone und die Vektorkontrolle gemittelt.

Die densitometrische Auswertung der Ergebnisse der Immundetektion erfolgte mit dem Programm ImageJ (Version 1.48) mithilfe der Funktion *Analyze* → *Gels* → *Plot Lanes* und Flächenintegration der Dichtedarstellung mittels *Wand trancig tool* nach vorheriger horizontaler Ausrichtung der Banden mittels *Image* → *Transform* → *Rotate*. Eine Normalisierung erfolgte, indem die Dichtewerte jeder einzelnen CLDN-Bande durch die Dichtewerte der zugehörigen β-Aktin-Bande dividiert wurden. Die densitometrisch ermittelten Werte wurden prozentual in Bezug auf die Kontrolle als Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student-T-Test berechnet. Die Ergebnisse wurden als statistisch signifikant angesehen, sofern der Signifikanzwert $p < 0,05$ war (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5. Ergebnisse

5.1. Expressionsanalyse von miR-155 und -146a bei MC und CU

Aus humaner Kolonmukosa von MC-, CU- und Kontroll-Probanden wurden miR-146a, miR-155 und sn-rnu6B isoliert und mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode ausgewertet.

5.1.1. Patientenkollektiv

Es wurde Kolonmukosa von 32 Patienten bezogen, 12 von CU-, 10 von MC- und 10 von Kontrollpatienten. Sofern vorhanden wurde von den CED-Patienten entzündete und nicht-entzündete Darmareale analysiert. Tabelle 12 zeigt die ausgewerteten Patientendaten.

Kontrollgruppe: Die Kontrollgruppe setzte sich aus 2 Frauen und 8 Männern zusammen. Sie waren zum Operationszeitpunkt durchschnittlich 65,3 Jahre alt (Tabelle 12). Die Proben wurden von Patienten mit der Diagnose ‚Kolonkarzinom‘ aus nicht infiltrierter, gesunder Darmmukosa bezogen. Zwischen Diagnosestellung und Operationstermin lagen wenige Wochen. Die Probanden besaßen einen durchschnittlichen Bodymaß-Index (BMI) von 27,4 kg/m² (Tabelle 12). 2 Patienten waren adipös (\triangleq BMI > 30 kg/m²), 4 leicht übergewichtig (\triangleq BMI zwischen 25 und 29,9 kg/m²) und 2 normgewichtig (\triangleq BMI zwischen 18,5 und 24,9 kg/m²) (Tabelle 12). Die Patienten der Kontrollgruppe wurden keiner neoadjuvanten Chemotherapie unterzogen.

Colitis Ulzerosa-Gruppe: Die CU-Gruppe setzte sich aus 9 Frauen und 3 Männern zusammen. Durchschnittlich waren die Probanden dieser Gruppe 40,3 Jahre alt, als sie operiert wurden und die Erstdiagnose wurde im Mittel 8,4 Jahre zuvor gestellt. Sie waren durchschnittlich 25 Jahre jünger als die Kontrollen ($p=0,00001$). Der durchschnittliche BMI dieser Gruppe war 24,1 kg/m² und gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt ($p=0,0407$; Tabelle 12). 1 Patient war adipös, 4 waren leicht übergewichtig, die übrigen normalgewichtig. 9 Probanden dieser Gruppe wurden präoperativ immunsuppressiv, mit variablen Kombinationen aus Prednisolon, Azathioprin, Mesalazin, Infliximab, Tacrolimus oder Vedolizumab, behandelt. 3 Probanden bekamen keine Immunsuppression.

Morbus Crohn-Gruppe: Die MC-Gruppe setzte sich aus 6 Frauen und 4 Männern zusammen. Zum Operationszeitpunkt waren die Patienten dieser Gruppe 37 Jahre alt, und somit etwa 3 Jahre jünger als die CU- und durchschnittlich 28,3 J jünger als die Kontrollpatienten ($p=0,00006$). Die Erstdiagnose wurde durchschnittlich im Alter von 28 Jahren gestellt (Tabelle 12), etwa 9 Jahre vor dem operativen Eingriff. Der durchschnittliche BMI dieser Gruppe war $20,3 \text{ kg/m}^2$, ein deutlich niedrigerer Wert als in der Kontrollgruppe ($p=0,0005$; Tabelle 12). 1 Patient dieser Gruppe war leicht übergewichtig, 6 waren normgewichtig und 2 untergewichtig ($\text{BMI} < 18,5 \text{ kg/m}^2$) (Tabelle 12). 5 Patienten aus dieser Gruppe wurden mit einer variablen Kombination aus Prednisolon, Azathioprin, Mesalazin oder Infliximab behandelt, 5 bekamen keine Immunsuppression.

Tabelle 12: Übersicht über die Patientendaten.

	Kontrollen:	CU:	MC:
Anzahl Proben gesamt:	10	12	10
Geschlechterverteilung (männlich : weiblich)	8:2	3:9	4:6
Jüngster und ältester Proband [Jahre]:	55-75	23-66	23-66
Durchschnittsalter (Ø) zum Operationszeitpunkt [Jahre]:	Ø 65,3 (σ 8,7)	Ø 40,3 *** (σ 11,9)	Ø 37 *** (σ 13,9)
Durchschnittsalter (Ø) bei Erstdiagnose [Jahre]:	Ø 65,2 (σ 8,8)	Ø 34,8 (σ 12,7)	Ø 28 (σ 14,0)
Durchschnittliche Dauer (Ø) von Erstdiagnose bis Operation [Jahre]:	Wenige Wochen	Ø 8,4 (σ 10,8)	Ø 8,6 (σ 4,7)
Durchschnittsgewicht (Ø) zum Operationszeitpunkt [kg]:	Ø 83,4 (σ 12,7)	Ø 67,1 (σ 11,2)	Ø 60 (σ 10,4)
Durchschnittlicher BMI (Ø) zum Operationszeitpunkt [kg/m²]	Ø 27,4 (σ 4,1)	Ø 24,1 * (σ 3,8)	Ø 20,3 *** (σ 3,4)
Immunsuppression (immunsupprimiert : Ø immunsupprimiert)	0 : 10	9 : 3	5 : 5

Ø=Mittelwert, σ=Standardabweichung. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 jeweils bzgl. Kontrollen.

5.1.2. Expressionsanalyse von miR-155 in der Kolonmukosa bei CU

Abbildung 8 zeigt die miR-155-Expression bei CU-Patienten in entzündeten und nicht-entzündeten Arealen der Mukosa als Vielfaches der Kontrolle sowie die Schwankungsbreite (SB). Die Ergebnisse der qRT-PCR ergaben eine um den Faktor 4 (2,8-5,7) ($p=0,008$) verstärkte Expression der miR-155 in entzündeten Arealen bei CU-Patienten gegenüber der Kontrolle. Im nicht-entzündeten Gewebe zeigte sich kein Expressionsunterschied zur Kontrolle ($p=0,42$). Der Vergleich zwischen entzündetem und nicht-entzündetem CU-Gewebe zeigte eine Erhöhung der miR-155-Expression im entzündetem Gewebe um den Faktor 4,4 ($p=0,001$).

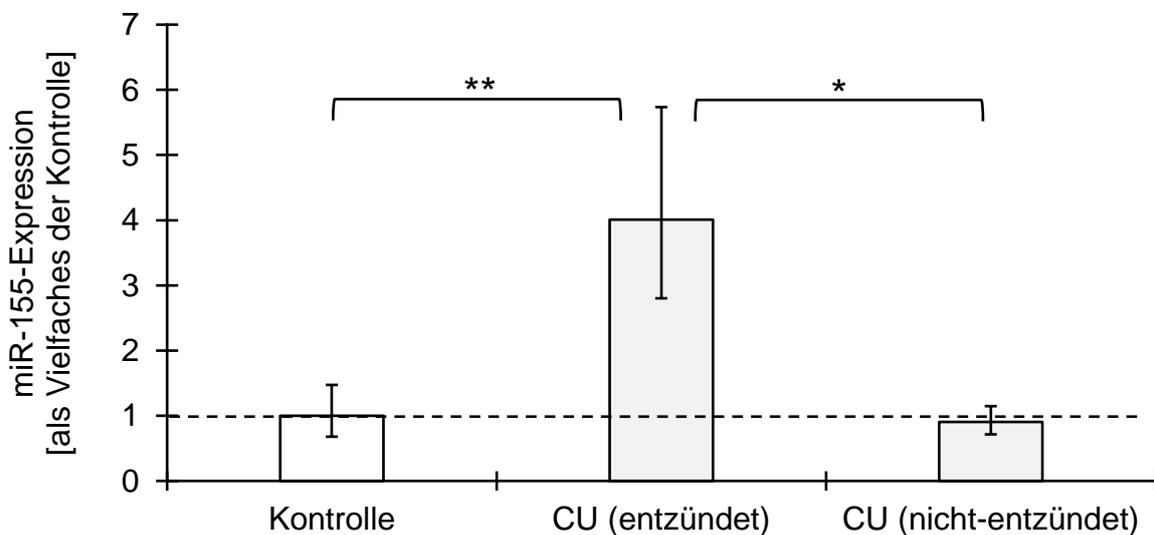


Abbildung 8: Erhöhte Expression von miR-155 in entzündeter Mukosa bei CU. Dargestellt ist die relative Expression von miR-155 in entzündeten ($n=12$) und nicht-entzündeten ($n=8$) Arealen von CU-Patienten als Vielfaches der Expression in der Kontrolle ($n=10$) mit der jeweiligen Schwankungsbreite. Im entzündeten Gewebe war miR-155 4-fach erhöht, im nicht-entzündeten Gewebe fand sich kein Unterschied zur Kontrolle ($*p<0,05$, $**p<0,01$).

5.1.3. Expressionsanalyse von miR-155 in der Kolonmukosa bei MC

Abbildung 9 zeigt die miR-155-Expression bei MC-Patienten in entzündeten und nicht-entzündeten Arealen der Mukosa als Vielfaches der Kontrolle und die SB. Es zeigte sich, dass miR-155 in entzündeten Arealen von MC-Patienten um den Faktor 2,5 (1,9-3,3) verstärkt exprimiert wurde verglichen mit der Kontrolle ($p=0,035$). In nicht-entzündeten Arealen der MC-Patienten zeigte sich keine signifikant veränderte Expression von miR-155 ($p=0,417$). In entzündeten Arealen wurde miR-155 um den Faktor 2,3 verstärkt exprimiert verglichen mit nicht-entzündeten Arealen bei den MC-Patienten ($p=0,020$).

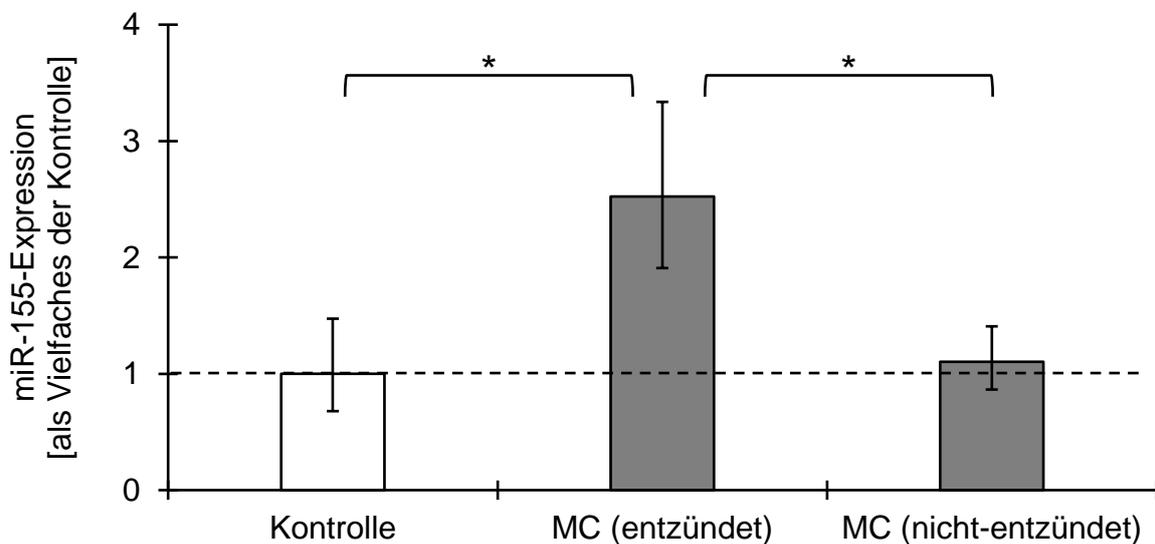


Abbildung 9: Erhöhte Expression von miR-155 in entzündeter Mukosa bei MC. Gezeigt ist die relative Expression der miR-155 in entzündeten ($n=10$) und nicht-entzündeten ($n=8$) Arealen von MC-Patienten bezogen auf die Kontrolle ($n=10$) mit zugehöriger SB. In entzündeten Arealen war miR-155 erhöht, in nicht-entzündeten Arealen fand sich kein Unterschied zur Kontrolle ($*p<0.05$).

5.1.4. miR-155 als Unterscheidungsmerkmal zwischen MC und CU

Sowohl für CU als auch für MC fanden sich eine signifikant verstärkte Expression der miR-155 in entzündeten Arealen im Vergleich zu nicht-entzündeten Arealen und gesunden Kontrollen. Jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in entzündeten Arealen zwischen CU- und MC-Gruppe ($p=0,160$). Somit konnte anhand der miR-155-Expressionsraten nicht zwischen CU und MC unterschieden werden.

5.1.5. Expressionsanalyse von miR-146a in der Kolonmukosa bei CU

Abbildung 10 zeigt die Expression von miR-146a bei CU-Patienten in entzündeten und nicht-entzündeten Arealen der Kolonmukosa bezogen auf die Kontrolle und die SB. Es zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der miR-146a-Expression um den Faktor 2,2 (1,5-2,9) im entzündeten Gewebe bezogen auf die Kontrolle. Die Erhöhung war nicht signifikant ($p=0,096$). Zwischen Kontrolle und nicht-entzündeten CU-Arealen fand sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,4351$). Der Vergleich der Expression in nicht-entzündetem mit entzündetem Gewebe zeigte eine signifikante Erhöhung um den Faktor 2,2 in Abhängigkeit der Entzündung ($p=0,022$).

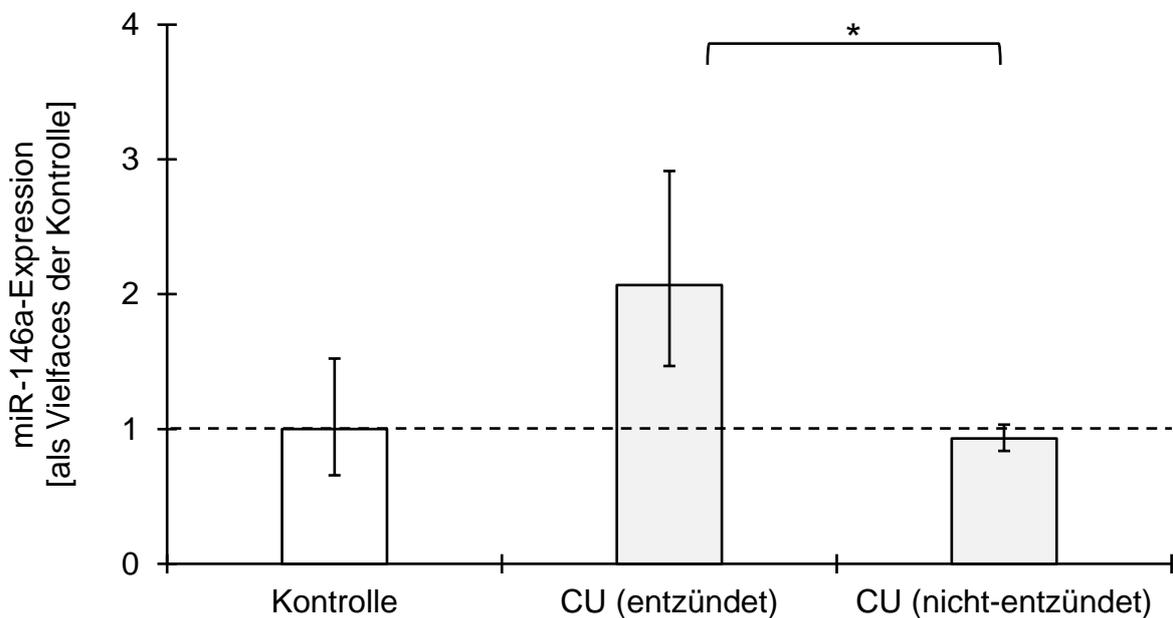


Abbildung 10: Expression von miR-146a bei CU. Dargestellt ist die relative Expression von miR-146a in entzündetem ($n=12$) und nicht-entzündetem ($n=8$) Gewebe von CU-Patienten bezogen auf die Kontrolle ($n=10$) mit zugehöriger SB. Im entzündeten Gewebe schien miR-146a tendenziell erhöht zu sein, der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,095$). Die miR-146a-Expression war in entzündeten CU-Arealen signifikant erhöht bezogen auf die nicht-entzündeten CU-Areale ($*p<0.05$).

5.1.6. Expressionsanalyse von miR-146a in der Kolonmukosa bei MC

Weder innerhalb der MC-Gruppe (entzündet vs. nicht entzündet) noch im Vergleich mit den Kontrollen konnte ein signifikanter Unterschied der Expression von miR-146a festgestellt werden (*Abbildung 11*).

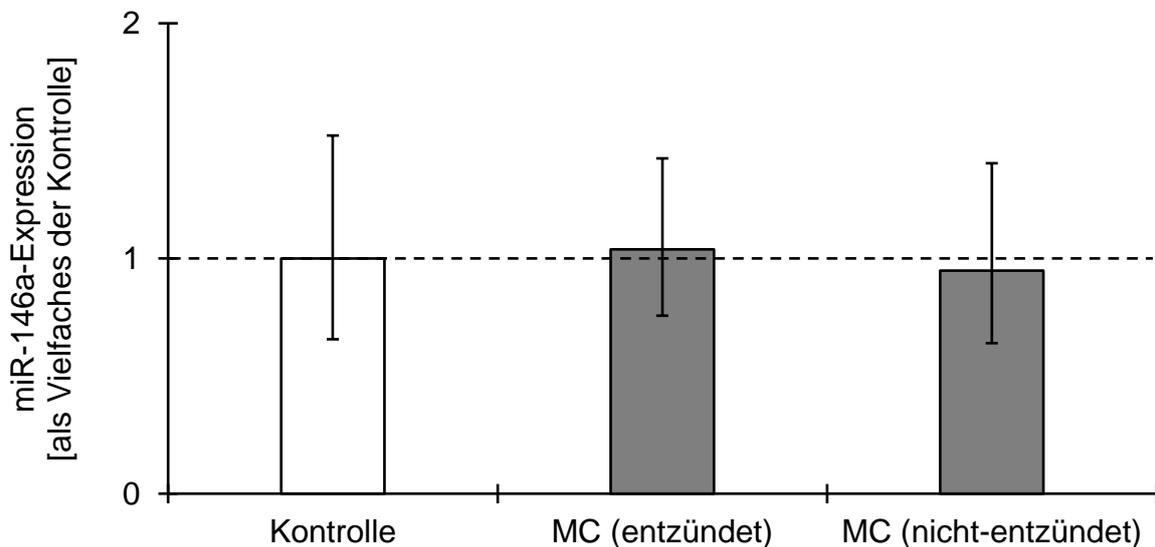


Abbildung 11: Keine Expressionsunterschiede von miR-146a zwischen entzündeten (n=10) und nicht-entzündeten (n=8) MC-Arealen und Kontrolle (n=10). Gezeigt ist die Expression als Vielfaches der Kontrolle mit SB.

5.1.7. miR-146a als Unterscheidungsmerkmal zwischen MC und CU

Weder für entzündetes CU-Gewebe noch für entzündetes MC-Gewebe finden sich signifikante Unterschied der miR-146a-Expression in Bezug auf die Kontrolle. Auch zwischen entzündetem CU- und MC-Gewebe findet sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,078$). Aufgrund der großen SB der miR-146a-Expression innerhalb der Kohorten ist eine zuverlässige Zuordnung zur Gruppe MC bzw. CU auf Basis der miR-146a-Expression nicht möglich.

5.2. Einfluss der miR-146a- und -155-Überexpression auf die Barrierefunktion im HT29/B6-Zellkulturmodell

Um zu untersuchen, ob die Expression von miR-146a bzw. -155 einen Einfluss auf die Barrierefunktion des Darmes hat, wurden miR-146a- bzw. -155-überexprimierende Klone der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT29/B6 auf Filterinserts kultiviert und der TER nach Ausbildung konfluenter polarisierter Zellmonolayer gemessen. Der TER der Überexpressionsklone wurde mit einer Vektorkontrolle verglichen. Zusätzlich zu den Widerstandsmessungen wurde die Proteinexpression der Claudine 1 und 2 im Westernblot analysiert.

5.2.1. Einfluss der Überexpression auf den TER

Es wurden insgesamt n=9 Zellkulturfilter je Zellklon in drei verschiedenen, unabhängigen Experimenten mit dem Widerstandsmessgerät vermessen. Zum Vergleich wurde der TER über Zellmonolayern der Vektorkontrollen gemessen. Weder für miR-146a ($p=0,307$) noch für miR-155 ($p=0,053$) konnten signifikante Unterschiede zu den Vektorkontrollen festgestellt werden (Abbildung 12).

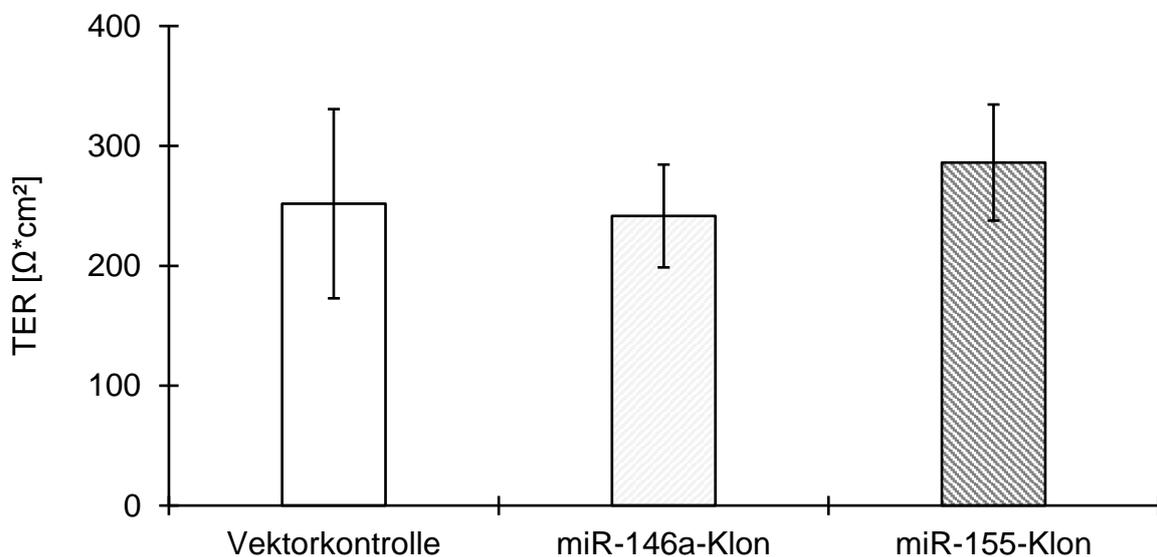


Abbildung 12: TER in miR-146a- und miR-155-Überexpressionsklonen. Vergleich des TER zwischen Vektorkontrolle (n=9), miR-146a- (n=9) und miR-155-Klon (n=9). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Widerstandswerte.

5.2.2. Einfluss der Überexpression auf die Proteinlevel von CLDN-1 und -2

Für die Proteinexpressionsanalyse wurden Proteinlysate der miR-Überexpressionsklone und der Vektorkontrolle mittels Western Blot und Immundetektion untersucht.

CLDN-1 wurde in den Überexpressionklonen genauso stark exprimiert wie in der Vektorkontrolle ($p=0,494$) (Abbildung 13).

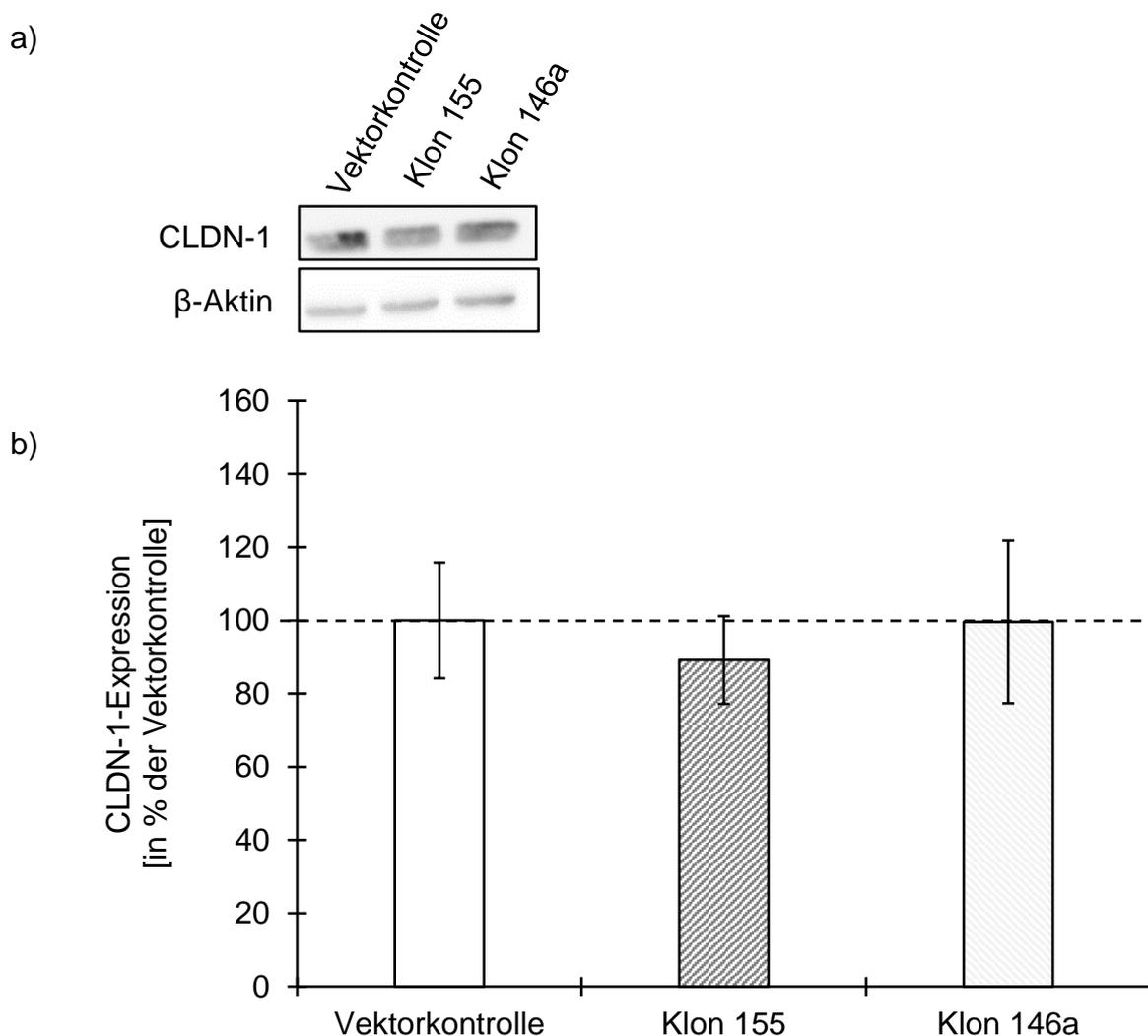


Abbildung 13: Keine Expressionsunterschiede von CLDN-1 in den Überexpressionsklonen. a) Repräsentativer Western Blot der CLDN-1-Expression in Vektorkontrolle, miR-146a- und miR-155-überexprimierenden Zellklonen. b) Densitometrische Auswertung der Signalstärke von CLDN-1 nach Normierung auf das entsprechende β -Aktinsignal. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=5$).

Bezogen auf die Kontrollen wurde CLDN-2 in den miR-146a-Überexpressionsklonen unverändert exprimiert ($p=0,455$). In den miR-155-Überexpressionsklonen zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante, Verminderung der CLDN-2-Expression um den Faktor 0,6 ($p=0,091$) (Abbildung 14).

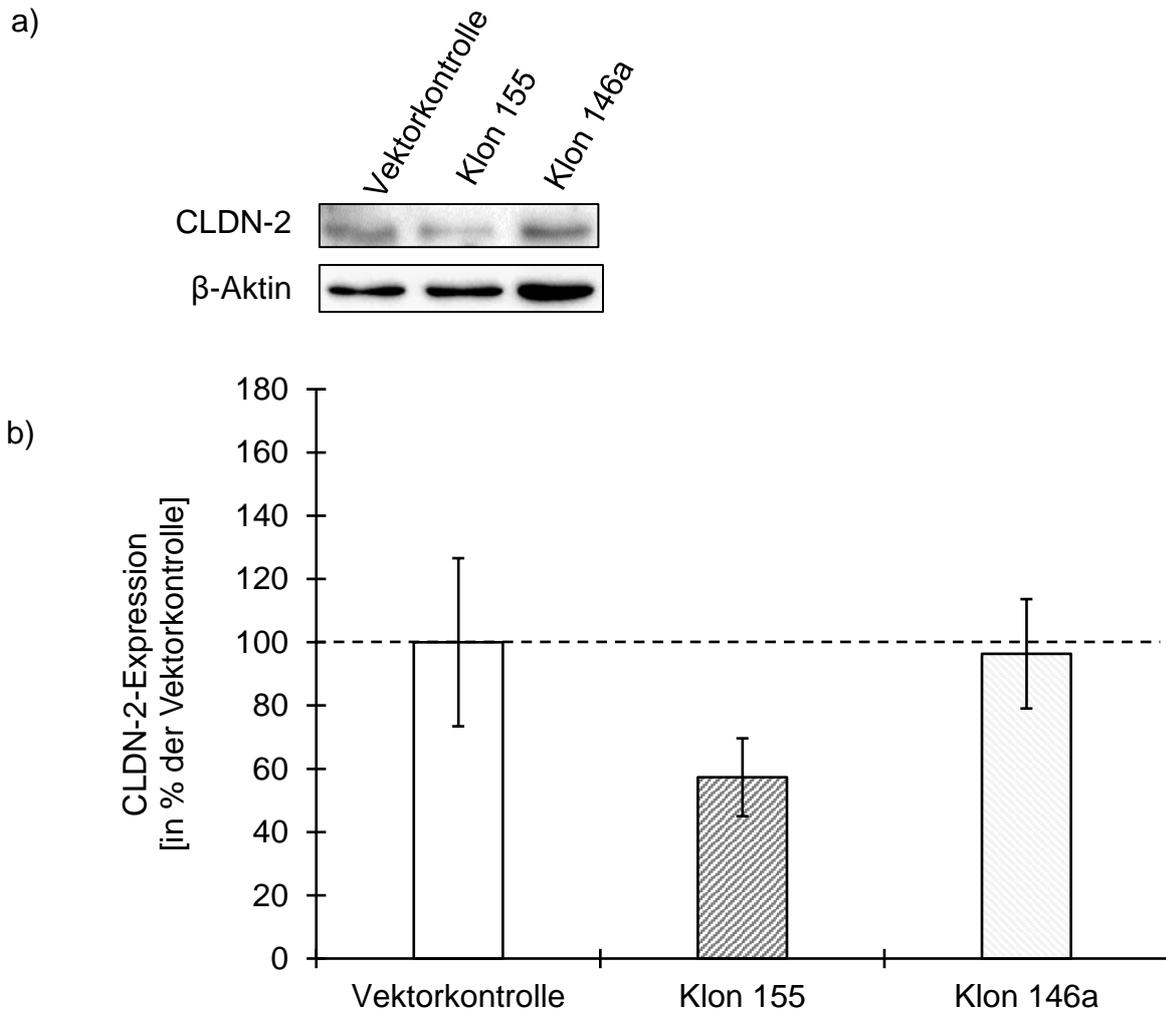


Abbildung 14: Keine Expressionsunterschiede von CLDN-2 in den Überexpressionsklonen. a) Repräsentativer Western Blot der CLDN-2- und β -Aktin-Expression in Vektorkontrollen, miR-146a- und miR-155-überexprimierenden Zellklonen. b) Densitometrische Auswertung der Signalstärke von CLDN-2 nach Normierung auf das entsprechende β -Aktinsignal in Vektorkontrolle und Überexpressionsklonen. Die tendenzielle Verminderung der CLDN-2-Expression in miR-155-überexprimierenden Zellen war nicht signifikant. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler ($n=5$).

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der mukosalen Entzündung auf die Expression von miR-155 und miR-146a bei MC- und CU-Patienten untersucht. Dazu wurde entzündete und nicht-entzündete humane Kolonmukosa von 10 MC- und 12 CU-Patienten gesammelt, deren miR-155- und miR-146a-Expression analysiert und mit der Expression in einer Kontrollgruppe (n=10) verglichen.

Bei der Auswertung zeigte sich, dass miR-155 in entzündetem Kolongewebe sowohl bei MC- als auch bei CU-Patienten, verglichen mit der Kontrollgruppe, verstärkt exprimiert wurde, während sich keine Expressionsunterschiede zu nicht-entzündeten Arealen fanden. Ferner konnte eine verstärkte Expression von miR-146a zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Kolonmukosa-Arealen bei CU-Patienten beobachtet werden, ein Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe war jedoch knapp nicht signifikant. Bei MC-Patienten dagegen gab es keine miR-146a-Expressionsunterschiede zwischen entzündeten und nicht-entzündeten Arealen oder zur Kontrollgruppe.

In vitro-Untersuchungen am Epithelmodell zeigten, dass eine Überexpression von miR-155 und miR-146a keinen Einfluss auf die epithelialen Barriereeigenschaften hatte. Sowohl der TER, als auch die Expression der Claudine 1 und 2 unterschieden sich in den Überexpressionsklonenn nicht von der Vektorkontrolle.

6.1. Expression von miR-155 und -146a in Abhängigkeit der Inflammation

Die miR-155-Expressionserhöhung in entzündeten MC- und CU-Arealen bei unveränderter Expression in nicht-entzündeten Arealen spricht für eine entzündungsabhängige Regulation: In dieser Arbeit konnte in der Kolonmukosa von erwachsenen CU-Patienten eine um den Faktor 4, bei erwachsenen MC-Patienten eine um den Faktor 2,3 erhöhte Expression der miR-155 im entzündeten Gewebe verglichen mit der Kontrollgruppe beobachtet werden. Weder für CU- noch für MC-Patienten waren Expressionsunterschiede in nicht-entzündeten Arealen verglichen mit der Kontrollgruppe zu beobachten. Ähnliche Resultate für die miR-155-Expression wurden in humanen Biopsien von Kindern, die an CED erkrankt waren, gefunden. Auch hier wurden keine Expressionsunterschiede zwischen nicht-entzündetem CU- und MC-Kolongewebe und Kontrollen gefunden, während die Expression im entzündeten Arealen erhöht war (Béres, et al., 2016). Dagegen beschreiben Fasseau

und Kollegen eine Hochregulation von miR-155 bei MC-Patienten sowohl in entzündeten als auch nicht-entzündeten Arealen (Fasseu, et al., 2010). In seiner Arbeit wurde jedoch eine andere miR-Quantifizierungsmethode verwendet und die Probandenpopulation war deutlich kleiner als in dieser Arbeit, was abweichende Ergebnisse erklären könnte (Schwarzenbach, da Silva, Calin, & Pantel, 2015). Auch in Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen eine Expressionserhöhung von miR-155 bewirkt (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017). In der Zusammenschau kann vermutet werden, dass miR-155 entzündungsabhängig reguliert wird.

miR-155 könnte als diagnostischer Biomarker der Entzündungsaktivität Verwendung finden: miR-155 wurde in den entzündeten Arealen der Kolonmukosa von CED-Patienten verstärkt exprimiert. Analysen konnten zeigen, dass sich diese verstärkte Expression auch auf die Expression in Fäkalproben niederschlägt. Bei insgesamt 61 CED-Patienten untersuchten Schönauer und Kollegen die Expression von miR-155 in Serum- und Fäkalproben. Dabei zeigte sich, dass miR-155 in den Fäkalproben sehr gut mit dem Calprotectin bzw. endoskopisch verifizierten Krankheitsgeschehen in MC und UC korrelierte und als Surrogatparameter für Calprotectin dienen könnte. Calprotectin ist ein weitverbreiteter Marker zur Erfassung der Entzündungsaktivität bei Darmentzündungen. Eine Korrelation von Krankheitsaktivität und miR-155-Expression im Serum konnte dagegen nicht nachgewiesen werden, weshalb die Autoren davon ausgingen, dass aus der lokalen miR-155-Expression im Darm nicht auf den Systemstatus des Patienten geschlossen werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Unterschied der miR-155-Expression in entzündetem Gewebe zwischen MC- und CU-Patienten feststellen werden, weshalb miR-155 aus Biopsien nicht zur Unterscheidung zwischen MC und CU geeignet scheint. Auch bei den Fäkalproben konnte anhand der miR-155-Expression nicht zwischen MC und CU unterschieden werden (Schönauen, et al., 2018). Obwohl miR-155 gut mit dem klinischen Krankheitsgeschehen korreliert (Schönauen, et al., 2018), scheint sie nicht CED-spezifisch zu sein. Denn bei 35 Patienten mit traumatischem Hirnschaden (TBI) war ihre Expression ebenfalls erhöht (Pan, et al., 2019). Beim TBI kommt es infolge der Stressreaktion des Körpers durch Sympathikus-Aktivierung zu einer Minderdurchblutung des Gastrointestinal-Trakts und u.a. zu intestinaler Mukosaischämie mit konsekutiver Entzündung und Barrierestörungen des Epithels.

Ungleich den CED liegt hier also keine primär immunologische Ursache zugrunde. miR-155 scheint jedoch auch beim TBI entzündlich reguliert zu werden (Pan, et al., 2019).

Die Rolle von miR-146a als diagnostischer Biomarker in Fäkalproben wurde bisher nicht genauer untersucht. Es könnte jedoch spekuliert werden, dass miR-146a möglicherweise zur Unterscheidung zwischen CU und MC geeignet wäre, da sie nur in entzündeten CU-Arealen circa 2-fach gegenüber der Kontrolle, nicht jedoch in entzündeten MC-Arealen, verstärkt exprimiert wurde. Allerdings war die Expressionszunahme zwischen entzündeten CU-Arealen und Kontrolle knapp nicht signifikant, eine größere Patientenpopulation könnte Abhilfe schaffen. Sofern sich auch hier die mukosale Expression auf die Expression in den Fäkalproben niederschlägt, wäre eine Unterscheidung zwischen CU und MC im aktiven Krankheitsgeschehen nicht-invasiv durch Fäkalproben denkbar. Allerdings gibt es auch gegenteilige Erkenntnisse bezüglich der Expression in entzündeten MC-Arealen. So konnten andere Forschungsgruppen ebenfalls eine erhöhte Expression von miR-146a in entzündeten MC-Arealen feststellen (Béres, et al., 2016). Auch im Mausmodell fand sich eine Hochregulation von miR-146a sowohl im DSS-Kolitismodell der Maus (Anzola, et al., 2018), das dem menschlichen Krankheitsbild CU ähnelt (Chassaing, Aitken, Malleshappa, & Vijay-Kumar, 2014), als auch im TNBS-Kolitismodell der Maus (Anzola, et al., 2018), das dem MC-Krankheitsbild ähnelt (Qin, Li, Wang, Huang, & Gao, 2019). Ferner widersprechen die Ergebnisse zu miR-146a in der entzündeten Mukosa erkrankter MC-Patienten den initialen Erwartungen, wonach miR-146a als antiinflammatorischer Marker in Entzündungen verstärkt exprimiert wird (Neudecker, Yuan, Bowser, & Eltzschig, 2017).

Denkbar wäre nun also, dass miR-146a entweder im Einklang mit den Erkenntnissen in dieser Arbeit kein universeller Entzündungsmarker ist und tatsächlich CU-spezifisch hochreguliert wird, oder aber die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse haben aufgrund bestimmter Limitationen nur eine eingeschränkte Gültigkeit.

6.2. Limitationen

Die z.T. widersprüchlichen Aussagen verschiedener Forschungsgruppen zu den Expressionsniveaus der miR könnten durch unterschiedliche Patientenkollektive/-größen sowie unterschiedlicher miR-Analyseverfahren bedingt sein. Insbesondere microArray-Analysen liefern teilweise deutlich von den qRT-PCR-Ergebnissen abweichende Resultate (Schwarzenbach, da Silva, Calin, & Pantel, 2015). Auch in dieser Arbeit ist das Patientenkollektiv mit lediglich 10 MC- bzw. 12 CU-Patienten relativ klein. Die Kollektivgrößen wurden durch vorherige Absprache mit einer Statistikerin ermittelt. Ferner erschwert die Verwendung verschiedener Normierungs-Referenzgene den Vergleich der miR-Expressionslevel zwischen verschiedenen Publikationen (Schwarzenbach, da Silva, Calin, & Pantel, 2015). In dieser Arbeit wurde für die Normierung die weit verbreitete und gut etablierte endogene Referenz sn-rnu6B verwendet (Béres, et al., 2016). Die Wahl der Referenz kann starken Einfluss auf die Interpretation der Daten und damit auf den Vergleich verschiedener Arbeiten haben. Es wird diskutiert, ob die gleichzeitige Prozession mehrerer Referenzsubstanzen vergleichbarere Ergebnisse liefern könnte (Schwarzenbach, da Silva, Calin, & Pantel, 2015).

In der vorliegenden Arbeit gab es Unterschiede zwischen den CED- und Kontrollkollektiven bezüglich Alter, Geschlecht und Gewicht. Das Kontrollkollektiv setzt sich aus Kolonkarzinompatienten zusammen. Es ist nicht vollkommen auszuschließen, dass Unterschiede in den Patientenkollektiven, zusätzlich zu den Einflüssen der Erkrankungen, Einfluss auf die Expression von miR-155 und miR-146a haben könnten. Im Rahmen dieser Arbeit ließ es sich jedoch nicht vermeiden, Kolongewebe von Karzinompatienten zu beziehen, da es von jüngeren Patienten für Vergleichszwecke nicht zur Verfügung stand.

Geschlecht und Alter haben wahrscheinlich keinen Einfluss auf die miR-Expression: Das Kolonkarzinom ist eine Erkrankung des hohen Alters, wobei weibliche Patientinnen zum Diagnosezeitpunkt in Deutschland durchschnittlich 76 Jahre alt sind, männliche Patienten 72 (Zentrum für Krebsregisterdaten; Robert Koch Institut, 2020). In dieser Arbeit sehen wir einen Altersdurschnitt von 65 Jahren. Demgegenüber erkranken vor allem jüngere Patienten an CED, die Diagnosestellung erfolgt bei CU-Patienten meist zwischen dem 30. und 40., bei MC-Patienten zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr (Burisch & Munkholm, 2015), (Cao, Huang, Jiang, & Dai, 2019). Wir

sahen in dieser Arbeit ein durchschnittliches Alter bei Erstdiagnose von 34,8 Jahren für CU und 28 Jahren für MC. Bis zur Operation vergingen circa weitere 6 Jahre bei CU bzw. 9 Jahre bei MC. Somit ergaben sich Altersunterschiede der Patientenkollektive von ca. 25 Jahren zwischen CU- und Kontrollgruppe und von ca. 28 Jahren zwischen MC- und Kontrollgruppe. Auch bezüglich der Erkrankungshäufigkeit der beider Geschlechter an CED und am Kolonkarzinom gibt es Unterschiede: Etwa 1,6-mal so viele Männer erkrankten an Darmkrebs wie Frauen (Zentrum für Krebsregisterdaten; Robert Koch Institut, 2020). Dies schlägt sich auch in der Häufigkeit männlicher Kontrollproben nieder, die in dieser Arbeit 4-fach gegenüber der Häufigkeit weiblicher Kontrollen erhöht war. An MC erkrankten etwas mehr Frauen als Männer, während kein Geschlechterunterschied bei CU besteht (Burisch & Munkholm, 2015). In dieser Forschungsarbeit wurden mehr Proben von Frauen (Faktor 3 bei CU, Faktor 2 bei MC) bezogen, was wohl ein rein zufälliger Effekt war. Der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Expression von mehr als 300 miRs im peripheren Blut wurde anhand von zwei gesunden Kohorten mit insgesamt 167 Probanden untersucht (Meder, et al., 2014). Demnach haben weder Alter noch Geschlecht einen Einfluss auf die Expression von miR-155 bzw. -146a.

Der BMI könnte dagegen einen Einfluss auf die miR-Expression haben, da ein hohes Körpergewicht die miR-Expression durch proinflammatorische Mediatoren beeinflussen kann: In der vorliegenden Arbeit gab es anthropomorphe Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven. Die Kontrollgruppe wies einen durchschnittlichen BMI von 27.4 kg/m² auf, während der BMI bei CU- (24.1 kg/m²) und MC-Patienten (20.3 kg/m²) signifikant geringer war. Auch der Anteil an adipösen und übergewichtigen Patienten war in der Kontrollgruppe erhöht. Die beobachteten Unterschiede werden auch in der Literatur beschrieben. Analysen zeigten, dass mindestens 18% aller CU- und 65% aller MC-Patienten von Mangelernährung betroffen sind, was sich häufig in einem reduzierten Körpergewicht niederschlägt (Scaldaferri, et al., 2017). Als Gründe für die Mangelernährung werden u.a. eine verminderte Nahrungsaufnahme wegen Übelkeit/Erbrechen oder Bauchschmerz, Gastrointestinale Verluste, Malabsorption durch die zerstörte Epithelbarriere sowie die Medikation angeführt. Demgegenüber ist ein Risikofaktor des Kolonkarzinoms unter anderem die Hyperalimentation und damit einhergehend das Übergewicht (Song & Giovannucci, 2016). Übergewicht geht mit erhöhten Entzündungsmediatoren einher

(Hijamans, et al., 2018). Da miR-155 und miR-146a entzündungsabhängig exprimiert werden, könnte der BMI also auch Einfluss auf deren Expression haben. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass miR-146a bei adipösen Patienten im peripheren Blut reduziert exprimiert wird (Hijamans, et al., 2018). Außerdem scheint das Gewicht auch Einfluss auf den Erkrankungsverlauf der CED zu nehmen, wobei mildere Erkrankungsverläufe bei übergewichtigen bzw. adipösen Patienten ($\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$) beobachtet werden und seltener Operationen und TNF- α -Therapien notwendig sind (Scaldaferri, et al., 2017). Insgesamt sind operierte Patienten durchschnittlich häufiger mangelernährt und untergewichtig (Fiorindi, et al., 2020).

6.3. Einfluss von miR-155 und -146a auf die Barrierefunktion im Zellmodell

Die Hypothese, dass die verstärkte Expression von miR-155 bzw. miR-146a einen Einfluss auf die Barriereintegrität hat, konnte am Zellmodell der Überexpressionsklone nicht bestätigt werden. Weder für die Widerstandsniveaus, noch für die Expression von CLDN-1 oder -2 zeigten sich Unterschiede zur Vektorkontrolle.

Anhand von bioinformatischen Methoden (Pan, et al., 2019) ist es möglich, bestimmte Ziel-RNAs für einzelne miRs zu prognostizieren. Eine mit der Datenbank ‚miRTarBase‘ (<http://mirtarbase.cuhk.edu.cn/php/index.php>; 07.09.2020) durchgeführte Analyse ergab jedoch keine direkten „matches“ von miR-146a und miR-155 für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Claudine CLDN-1 und -2.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass miR-155 bzw. miR-146a über inflammatorische Signalkaskaden die Zusammensetzung und Integrität der epithelialen Barrierefunktion doch beeinflussen könnte. Dies könnte unter Einfluss proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise TNF- α oder IFN- γ in weiterführenden Studien am Zellmodell untersucht werden. Nicht zu Letzt bleibt anzumerken, dass es sich hier um ein in vitro-Modell handelt, das insbesondere ohne die Komplexität des Immunsystems des menschlichen intestinalen Traktes funktioniert. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass miR-155 und eventuell auch miR-146a entzündungsabhängig, jedoch nicht CED-spezifisch, reguliert werden. Die Ergebnisse der in vitro-Zellkulturversuche unter nicht-inflammatorischen Bedingungen sprechen gegen einen direkten regulatorischen Einfluss der untersuchten miRs auf die Barrierefunktion im Zellmodell.

Literaturverzeichnis

- (2004). In U.-N. Riede, M. Werner, & H.-E. Schäfer, *Allgemeine und spezielle Pathologie 5. Auflage* (S. 705-707 (Morbus Crohn); 716-718 (Colitis Ulcerosa)). Thieme-Verlag.
- Absolute und relative Quantifizierung für die qPCR im Vergleich.* (16. Oktober 2019). Von ThermoFischer Scientific: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html> abgerufen
- Anzola, A., González, R., Gámez-Belmonte, R., Ocón, B., Aranda, C., Martínez-Moya, P., López-Posadas, R., Hernández-Chirlaque, C., de Medina, F., Martínez-Augustin, O. (26. November 2018). miR-146a regulates the crosstalk between intestinal epithelial cells, microbial components and inflammatory stimuli. *nature - Scientific Reports*.
- Béres, N., Szabó, D., Kocsis, D., Szucs, D., Kiss, Z., Müller, K., Lendvai, G., Kiss, A., Artó, A., Sziksz, E., Vannay, A., Szabó, A., Veres, G. (11. Januar 2016). Role of Altered Expression of miR-146a, miR-155, and miR-122 in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease. *ibdjournal*.
- Burisch, J., & Munkholm, P. (29. Januar 2015). The epidemiology of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, S. 942-951.
- Cao, B., Zhou, X., Ma, J., Zhou, W., Yang, W., Fan, D., & Hong, L. (1. April 2017). Role of MiRNAs in Inflammatory Bowel Disease. *Springer Science+Business Media New York*.
- Cao, Q., Huang, Y.-H., Jiang, M., & Dai, C. (22. November 2019). The prevalence and risk factors of psychological disorders, malnutrition and quality of life in IBD patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, S. 1458-1466.
- Cell Signaling Technology. (14. September 2020). *Antibodies*. Von <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/> abgerufen
- Chassaing, B., Aitken, J., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (4. Februar 2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*.

- Cichon, C., Sabharwal, H., Rüter, C., & Schmidt, A. (1. August 2014). MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions. *Tissue Barriers*.
- Elektrophorese*. (11. August 2020). Von https://www.tu-ilmenau.de/fileadmin/media/mne_nano/Lehre/Vorlesung/Bionanotechnologie/15BionanoWS2006.pdf abgerufen
- Fasseu, M., Tréton, X., Guichard, C., Pedruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Richard, C., Aparicio, T., Daniel, F., Soulé, J., Moeau, R., Bouhnik, Y., Laburthe, C., Groyer, A., Ogier-Denis, E. (5. Oktober 2010). Identification of Restricted Subsets of Mature microRNA Abnormally Expressed in Inactive Colonic Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS one Volume 5*.
- Fiorindi, C., Luceri, C., Dragoni, G., Piemonte, G., Scaringi, S., Staderini, F., Nannoni, A., Ficari, F., Giudici, F. (22. Juli 2020). GLIM Criteria for Malnutrition in Surgical IBD Patients: A Pilot Study. *nutrients*.
- Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., & Nusrat, A. (10. Mai 2017). Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *The New York Academy of Science*.
- Guil, S., & Esteller, M. (25. März 2015). RNA-RNA interactions in gene regulation: the coding and noncoding players. *Trends in Biochemical Sciences - Volume 40*, S. 248-256.
- Heller, F., Florian, P., Bojarski, C., Richter, J., Christ, M., Hillenbrand, B., Mankertz, J., Gitter, A., Bürgel, N., Fromm, M., Zeitz, M., Fuss, I., Strober, W., Schulzke, J. (August 2005). Interleukin-13 is the key effector Th2 Cytokine in Ulcerative Colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology - Volume 129*, S. 550-564.
- Hering, N., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. (4. Januar 2012). Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *The Journal of Physiology*.
- Herold, G. (2018). Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED). In *Innere Medizin* (S. 479-486). Köln.

- Hijamans, J., Diehl, K., Bammert, T., Kavlich, P., Lincenberg, G., Greiner, J., Stauffer, B., DeSouza, C. (2018). Influence of overweight and obesity on circulating inflammation-related microRNA. *MicroRNA - Volume 7*, S. 148-154.
- John, L., Fromm, M., & Schulzke, J.-D. (27. Juli 2011). Epithelial barriers in intestinal inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling - Volume 15*.
- Kreusel, K., Fromm, M., Schulzke, J., & Hegel, U. (Oktober 1991). Cl-secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *American Journal of Physiology*, S. 574-582.
- Livak, K., & Schmittgen, T. (Dezember 2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ -Method. *Methods - Volume 25*, S. 402-408.
- Mahesh, G., & Biswas, R. (2019). MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research Volume 39*, S. 321-330.
- Martini, E., Krug, S., Siegmund, B., Neurath, M., & Becker, C. (2017). The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. *cmgh - Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, S. 33-46.
- Meder, B., Backes, C., Haas, J., Leidinger, P., Stähler, C., Großmann, T., Vogel, B., Frese, K., Giannitsis, E., Katus, H., Meese, E., Keller, A. (30. Juni 2014). Influence of the Confounding Factors Age and Sex on MicroRNA Profiles from Peripheral Blood. *Clinical Chemistry*, S. 1200-1208.
- Neudecker, V., Yuan, X., Bowser, J., & Eltzschig, H. (1. Februar 2017). MicroRNAs in mucosal inflammation. *JMolMed*, S. 935-949.
- Oshima, T., & Miwa, H. (5. April 2016). Gastrointestinal mucosal barrier function and diseases. *Journal of Gastroenterology*, S. 768-778.
- Pan, P., Bai, L., Hua, X., Wang, Y., Jiang, X., Cheng, X., Song, Y., Yu, X. (Dezember 2019). mir-155 Regulates claudin1 Expression in Humans With Intestinal Mucosa Dysfunction After Brain Injury. *Elsevier - Volume 51*, S. 3474-3480.

- Qin, W., Li, L., Wang, T., Huang, H., & Gao, Y. (28. Mai 2019). Urine Proteome Changes in a TNBS-Induced Colitis Rat Model. *Proteomics Clinical Applications*.
- Runtsch, M., Hu, R., Alexander, M., Wallace, J., Kagele, D., Petersen, C., Valentine, J., Welker, N., Bronner, M., Chen, X., Smith, D., Ajami, N., Petrosino, J., Round, J., O'Connell, R. (10. September 2015). MicroRNA-146a constrains multiple parameters of intestinal immunity and increases susceptibility to DSS colitis. *Oncotarget Volume 6 No. 30*.
- Runtsch, M., Round, J., & O'Connell, R. (1. Oktober 2014). MicroRNAs and the regulation of intestinal homeostasis. *Frontiers In Genetics Volume 5 Artikel 347*, S. 347.
- Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Lopetuso, L., Musca, T., Ingravalle, F., Sicignano, L., Mentella, M., Miggiano, G., Mele, M., Gaetani, E., Graziani, C., Petito, V., Cammaroto, G., Marzetti, E., Martone, A., Landi, F., Gasbarrini, A. (3. Januar 2017). Nutrition and IBD: Malnutrition and/or Sarcopenia? A Practical Guide. *Hindawi Publishing Corporation Gastroenterology Research and Practice Volume 2017*.
- Schönauen, K., Le, N., von Arnim, U., Schulz, C., Malfertheiner, P., & Link, A. (12. April 2018). Circulating and Fecal microRNAs as Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases Volume 24*, S. 1547-1557.
- Schwarzenbach, H., da Silva, A., Calin, G., & Pantel, K. (November 2015). Which is the accurate data normalization strategy for microRNA quantification? *Klinische Chemie*, S. 1333-1342.
- Serva.de. (01. 08 2020). Von Gebrauchsanleitung - BCA Protein Micro Assay Kit: https://www.serva.de/www_root/documents/39229_d.pdf abgerufen
- Song, M., & Giovannucci, E. (1. September 2016). Preventable Incidence and Mortality of Carcinoma associated with lifestyle factors among white adults in the United States. *JAMA Oncology*, S. 1154-1161.
- Spektrum.de. (11. August 2020). Von Proteinbestimmung - Lexikon der Biologie: <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteinbestimmung/54131> abgerufen

- Stallmach, A., Häuser, W., L'hoest, H., & Marschall, U. (16. April 2019). Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa - Herausforderungen an die Versorgung. *Barmer GEK - Gesundheitswesen aktuell 2012* (<https://www.barmer.de/blob/71456/1f5b78999d9b260f1b2a6ccbc4518170/data/die-chronisch-entzuendlichen-darmerkrankungen-morbus-crohn-und-colitus-ulcerosa.pdf>), S. 286-309. Von <https://www.barmer.de/blob/71456/1f5b78999d9b260f1b2a6ccbc4518170/data/die-chronisch-entzuendlichen-darmerkrankungen-morbus-crohn-und-colitus-ulcerosa.pdf> abgerufen
- Steinbrenner Laborsysteme GmbH. (14. September 2020). *Was ist der Ct oder Cq Wert?* Von Steinbrenner Laborsysteme GmbH: https://steinbrenner-laborsysteme.de/avada_faq/was-ist-der-ct-oder-cq-wert/ abgerufen
- Tam, W. (22. August 2001). Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA. *Gene - Volume 274*, S. 157-167.
- Thermo Fisher Scientific. (22. 02 2018). *mirVana™ miRNA Isolation Kit, mit Phenol*. Von <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1560> abgerufen
- ThermoFisher*. (01. 08 2020). Von Pierce™ BCA™ Protein-Assay: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227#/23227> abgerufen
- ThermoFisher Scientific. (14. September 2020). *mirVana™ miRNA-Isolationskit Gebrauchsanweisung*. Von <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AM1560#/AM1560> abgerufen
- ThermoFisher Scientific. (14. September 2020). *TaqMan multiplex real-time PCR*. Von ThermoFisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1600-PJT1731-COL12035-TaqManMultiplex-qPCR-ProdBulletin-Global-FHR.pdf> abgerufen
- Wu, F., Zikusoka, M., Trindade, A., Dassopoulos, T., Harris, M., Bayless, T., Brant, S., Chakravarti, S., Kwon, J. (November 2008). MicroRNAs are differentially

expressed in Ulcerative Colitis and alter expression of macrophage inflammatory Peptide-2alpha. *Gastroenterology*, S. 1624-1635.

Yuan, J., Reed, A., Chen, F., & Stewart Jr, C. (22. Februar 2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*.

Zeissig, S., Bürgel, N., Günzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A., Zeitz, M., Fromm, M., Schulzke, J.-D. (5. Juli 2006). Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease*, S. 61-72.

Zentrum für Krebsregisterdaten; Robert Koch Institut. (25. August 2020). Von Krebs in Deutschland für 2015/2016:
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf?__blob=publicationFile
abgerufen

Zhu, L., Han, J., Li, L., Wang, Y., Li, Y., & Zhang, S. (27. Juni 2019). Claudin Family Participates in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Colitis-Associated Colorectal Cancer. *frontiers in Immunology*.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Philipp Reiß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „microRNA-155 und -146a: Expressionsanalyse in der Kolonmukosa von Morbus Crohn- und Colitis Ulzerosa-Patienten und Einfluss der Überexpression auf die Epithelbarriere im Zellkulturmodell“ (engl.: „microRNA-155 and -146a: Expression analysis in the colon mucosa of patients with Crohn’s Disease and Ulcerative Colitis and influence of overexpression on epithelial barrier function in a cell culture model“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin E. Kreis, ohne den diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Ich danke meiner Betreuerin Dr. Nina Hering, die mir während den Höhen und Tiefen dieser Arbeit, wann immer auch nötig, mit Rat und Tat zur Seite stand. Die nette, kompetente und motivierende Betreuung durch sie sowie das Team der chirurgischen Forschungsgruppe hat den Erfolg dieser Arbeit erst ermöglicht. In diesem Zuge mein Dank an meine Kollegen und die beste Gesellschaft im Labor, die ich mir erhoffen konnte: Elisabeth Hahn und Marco Arndt.