

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

MicroRNA im Blut und im Stuhl als Biomarker für
chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Katharina Leonie Schönauen
aus Neuss
Magdeburg 2018

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Schönauen, Katharina Leonie

MicroRNA im Blut und im Stuhl als Biomarker für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen. - 2018.
- 85 Blatt (Bl.), 18 Abbildungen (Abb.), 1 Tabelle (Tab.), 1 Anlage (Anl.)

Kurzreferat

Das Management von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), wie Morbus Crohn (CD) und Colitis ulcerosa (UC), könnte durch die Anwendung von nicht-invasiven Biomarkern, welche beispielsweise die Krankheitsaktivität widerspiegeln, verbessert werden. Häufig in der Diagnostik eingesetzte serologische Parameter, wie das C-reaktive Protein (CRP), sind jedoch aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität nur eingeschränkt für die Therapieüberwachung geeignet. MicroRNAs (miRNAs) stellen eine neue Klasse an Molekülen dar, die hervorragende Stabilität aufweisen. Ziel dieser Promotionsarbeit war es, die Veränderungen von unterschiedlichen miRNAs, wie miR-16, miR-21, miR-155 und miR-223, im Serum und im Stuhl zu untersuchen sowie deren Eignung als Biomarker für CED zu evaluieren. Insgesamt wurden 51 Serum- und 57 Stuhlproben von CED-Patienten mittels qRT-PCR untersucht. Die CED-Serumproben zeigten in Korrelation mit entzündlicher Aktivität eine erhöhte Expression von miR-16, miR-21 und miR-223 im Vergleich zu Kontrollproben. In Subgruppen-Analysen waren die Proben von CD-Patienten mit höheren miRNA-Expressionen im Vergleich zu den Kontrollen und zu UC-Patienten assoziiert. Weiterhin beobachteten wir eine starke Zunahme der Expression aller vier miRNAs in Stuhlproben von CED-Patienten. Im Gegensatz zur Expression im Serum zeigten Stuhlproben von UC-Patienten eine deutlich höhere Expression von miR-16, miR-155 und miR-223. Eine klinische Remission bei CED-Patienten war mit einer Normalisierung der fäkalen miRNA-Expression assoziiert. Trotz der signifikanten Korrelation mit der Erkrankungsaktivität, korrelierte lediglich fäkale miRNA mit fäkalem Calprotectin (FC) und dem CRP-Wert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem eine systematische Analyse potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression im Stuhl, wie die untersuchte Stuhlmenge, Blut im Stuhl und die Lagerungstemperatur, durchgeführt.

Schlüsselwörter

miRNA, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Stuhl, Biomarker

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einführung	1
1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	1
1.1.1. Ätiopathogenese	1
1.1.2. Klinik	2
1.1.3. Diagnostik	4
1.1.4. Therapie	4
1.2. Biomarker	5
1.3. Fäkales Calprotectin als bestuntersuchter Biomarker in CED	6
1.4. MicroRNA	7
1.4.1. miRNA-Biogenese	7
1.4.2. Funktion von miRNAs	9
1.4.3. miRNAs als Biomarker	10
1.5. miRNAs in CED	10
1.5.1. miRNA-Expression im Gewebe von CED-Patienten	10
1.5.2. miRNA-Expression im Blut von CED-Patienten	11
1.5.3. miRNA-Expression im Stuhl von CED-Patienten	12
1.6. Fragestellung der Arbeit	13
1.7. Ziel der Arbeit	13
2. Material und Methoden	15
2.1. Ethik und Patienten	15
2.2. Studiendesign	16
2.3. Charakterisierung von CED-Patienten	16
2.4. CED-Erkrankungsaktivität und -Diagnose	18
2.5. Untersuchung potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression	18
2.5.1. Stuhlmengenuntersuchung	18
2.5.2. Stuhl-Blut-Proportionstestung	18
2.5.3. Temperaturstabilitätstest	19
2.6. Methoden	19

2.6.1.	Probenasservierung	19
2.6.2.	miRNA-Isolation.....	19
2.6.3.	Photometrische RNA-Messung.....	21
2.6.4.	Reverse Transkription	21
2.6.5.	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion	22
2.6.6.	Analyse von CRP-Wert und fäkalem Calprotectin (FC).....	24
2.7.	Statistische Analyse	24
2.8.	Eigenanteil.....	25
3.	Ergebnisse.....	26
3.1.	miRNAs im Serum bei CED-Patienten.....	26
3.1.1.	miRNA-Expression in CED-Serumproben.....	26
3.1.2.	miRNA-Expression in CD- und UC-Serumproben	27
3.1.3.	miRNA-Expression in Serumproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CED-Patienten in Remission	28
3.1.4.	miRNA-Expression in Serumproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CD-Patienten in Remission.....	29
3.1.5.	miRNA-Expression in Serumproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung und von UC-Patienten in Remission.....	30
3.2.	miRNAs im Stuhl bei CED-Patienten.....	31
3.2.1.	miRNA-Expression in CED-Stuhlproben.....	32
3.2.2.	miRNA-Expression in CD- und UC-Stuhlproben	33
3.2.3.	miRNA-Expression in Stuhlproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CED-Patienten in Remission	33
3.2.4.	miRNA-Expression in Stuhlproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CD-Patienten in Remission.....	34
3.2.5.	miRNA-Expression in Stuhlproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung und von UC-Patienten in Remission.....	35
3.3.	miRNA-Expression und Korrelation zu Entzündungsmarkern in CED	36
3.4.	Analyse potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression	38
3.4.1.	Einfluss der Stuhlextraktionsmenge auf die miRNA-Expression im Stuhl	39
3.4.2.	Einfluss von Blutbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl.....	40
3.4.3.	Einfluss von Serumbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl	42
3.4.4.	Systematische Stabilitätsanalyse von miRNA im Stuhl.....	44
4.	Diskussion	46
4.1.	miRNA-Veränderung im Gewebe und Limitationen	46
4.2.	Auswahl der miRNAs	47
4.2.1.	miR-16	47

4.2.2. miR-21	47
4.2.3. miR-155	48
4.2.4. miR-223	48
4.3. Zirkulierende miRNAs.....	49
4.4. miRNA-Expression im Serum bei CED-Patienten	50
4.5. miRNA-Expression im Stuhl bei CED-Patienten	51
4.6. Korrelation von miRNAs in verschiedenen Probenarten und mit laborchemischen Parametern.....	52
4.7. Mögliche Ursachen für differentielle miRNA-Expressionen	53
4.8. Methodologische Einflussfaktoren auf die miRNA-Expressionsanalyse	54
4.8.1. Normalisierung der Stuhlproben.....	55
4.8.2. Herkunft der miRNAs im Stuhl	55
4.8.3. miRNA-Expression in verschiedenen Stuhlmengen.....	56
4.8.4. miRNA-Expression in Stuhl, Blut und Serum	57
4.8.5. miRNA-Stabilität im Stuhl.....	58
4.9. Limitationen der Arbeit.....	59
4.10. Ausblick	59
5. Zusammenfassung	61
Literaturverzeichnis.....	IX
Danksagung.....	XIX
Ehrenerklärung.....	XX
Darstellung des Bildungsweges.....	XXI
Darstellung der bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen	XXIII
Anlage	XXIV

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: miRNA-Biogenese.....	8
Abb. 2: Studiendesign.....	16
Abb. 3: miRNA-Expression in CED-Serumproben im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	27
Abb. 4: miRNA-Expression in CD- und UC-Serumproben sowie in der Kontrollgruppe.....	28
Abb. 5: miRNA-Expression in Serumproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung..... und von CED-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.....	29
Abb. 6: miRNA-Expression in Serumproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung..... und von CD-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.....	30
Abb. 7: miRNA-Expression in Serumproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung..... und von UC-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.....	31
Abb. 8: miRNA-Expression in CED-Stuhlproben im Vergleich zur Kontrollgruppe.....	32
Abb. 9: miRNA-Expression in CD- und UC-Stuhlproben sowie in der Kontrollgruppe.....	33
Abb. 10: miRNA-Expression in Stuhlproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung..... und von CED-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.....	34
Abb. 11: miRNA-Expression in Stuhlproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung..... und von CD-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.....	35
Abb. 12: miRNA-Expression in Stuhlproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung..... und von UC-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.....	36
Abb. 13: Korrelation der miRNA-Expression in Stuhl und Serum.....	37
Abb. 14: Korrelation zwischen den entzündlichen Biomarkern und der miRNA-Expression..... in CED-Patienten.....	38
Abb. 15: Einfluss der Stuhlextraktionsmenge auf die miRNA-Expression im Stuhl.....	40
Abb. 16: Einfluss von Blutbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl.....	42
Abb. 17: Einfluss von Serumbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl.....	44
Abb. 18: Systematische Stabilitätsanalyse von miRNA im Stuhl.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CED-Probanden.....	17
-------------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGO	Argonaut-Protein
ALG	<i>Argonaute-like Gene</i>
AMO	<i>Anti-MiRNA oligonucleotides</i>
Anl.	Anlage
ASA	Aminosalicylsäure
ASCA	<i>Anti-Saccharomyces cerevisiae</i>
ATG16L1	<i>Autophagy-related gene 16-like 1</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Morbus Crohn (<i>Crohn's Disease</i>)
CDAI	<i>Crohn's Disease Activity Index</i>
cDNA	<i>copyDNA</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
cel	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CI	Colitis indeterminata
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>Threshold Cycle</i>
DAI	<i>Disease Activity Index</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
FC	fäkales Calprotectin
g	Erdbeschleunigung
GI	gastrointestinal
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
h	Stunden
Hb	Hämoglobin
HDL	<i>High-Density-Lipoprotein</i>
Hkt	Hämatokrit
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Hopx	HOP Homeobox Gen
IRGM	<i>Immunity-related GTPase family M</i>
IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
KRK	kolorektales Karzinom
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>

miRNA/miR	microRNA
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
ncRNA	<i>non-coding RNA</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
pANCA	<i>Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PMN	<i>polymorphonuclear leukocytes</i>
pmol	Pikomol
pre-miRNA	<i>precursor miRNA</i>
pri-miRNA	<i>primary miRNA</i>
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PTPN	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type</i>
p	Signifikanzwert
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
Ran	<i>Ras-related nuclear protein</i>
RhoB	<i>Ras Homolog Family Member B</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPE	Wasch-Puffer, enthalten im <i>miRNeasy Mini Kit</i> von der Firma QIAGEN
RWT	Wasch-Puffer, enthalten im <i>miRNeasy Mini Kit</i> von der Firma QIAGEN
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
SYBR-Green	asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, zum Nachweis von doppelsträngiger DNA
TATA	Basen-Sequenz T(hymin)-A(denin)-T(hymin)-A(denin)
TE	TRIS-EDTA
TH	T-Helfer-Zelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRBP2	<i>Trans-activation response RNA-binding protein 2</i>
UC	Colitis ulcerosa (<i>Ulcerative Colitis</i>)
vs.	versus, gegenübergestellt
WMA	<i>World Medical Association</i>
μ l	Mikroliter
18S rRNA	18S (Svedberg) ribosomale Ribonukleinsäure (interne Kontrolle für qRT-PCR)
*	Signifikanz

1. Einführung

Einleitend wird eine Übersicht über die Ätiopathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) gegeben und auf Biomarker wie das fäkale Calprotectin (FC) eingegangen.

1.1. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Zu den CED werden die Colitis ulcerosa (UC) und der Morbus Crohn (CD) gezählt [1]. UC wurde 1859 erstmals von Samuel Wilks beschrieben [1]. 1932 schilderte Burrill B. Crohn die Pathologie und Klinik von CD, damals beschrieben als regionale Ileitis [2]. In Europa wurden die höchsten Inzidenzen für CD mit 12,7 und für UC mit 24,3 pro 100 000 Personenjahre angegeben. Die höchste Prävalenz lag in Europa für CD bei etwa 0,3%, für UC bei 0,5%. Der Häufigkeitsgipfel der CED liegt in der zweiten bis vierten Lebensdekade [3].

1.1.1. Ätiopathogenese

Die genaue Ätiopathogenese dieser multifaktoriellen, komplexen Erkrankungen ist noch nicht vollständig geklärt, sodass in den letzten Jahren zahlreiche Forschungsprojekte durchgeführt wurden, um die genetische Pathogenese der CED zu erschließen. Gegenwärtig ist die meist akzeptierte Theorie der CED-Pathophysiologie, dass die gastrointestinale Entzündung durch eine inadäquate angeborene Immunantwort auf die Darmflora als luminalen Faktor bei genetisch prädisponierten Personen ausgelöst wird [4,5].

Durch Untersuchungen von *Single Nucleotide Polymorphismen* (SNP) in Genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) konnte Aufschluss über viele CED-Genloci und deren Assoziationen mit anderen Autoimmunerkrankungen gegeben werden. Von insgesamt 163 identifizierten CED-spezifischen Genloci waren 110 mit CD und UC assoziiert, 30 Loci CD- und 23 UC-spezifisch [6]. Abraham et al. beschäftigten sich mit dem Zusammenhang des intestinalen Immunsystems und der CED-Entwicklung. Eine zentrale Rolle in der CED-Pathogenese spielen beispielsweise Gene der IL-23/TH17-Signalkaskade, wie IL23R, JAK2, STAT3 und p40 [7]. Die Anfälligkeit für CD ist assoziiert mit NOD2-Polymorphismen. NOD2 bindet an bakterielle Lipopolysaccharide, aktiviert den NF- κ B-Signalweg und stellt somit einen zentralen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar [8,9]. Für das Auftreten von CD ist außerdem eine

Assoziation mit den Genen ATG16L1 und IRGM, welche beide an der Autophagozytose beteiligt sind, sowie mit IL-12B und PTPN2 bekannt [10–12]. Die meisten mit CED in Zusammenhang gebrachten Genloci wirken für CD und UC gleichermaßen als genetische Risikofaktoren. Es gibt allerdings auch Ausnahmen, welche individuelle genetische Unterschiede der beiden Erkrankungen widerspiegeln. Während NOD2 und PTPN22 als CD-Risikofaktoren gelten, scheinen sie für UC protektiv zu wirken [6]. GWAS ergaben eine Assoziation von CED mit dem *Major Histocompatibility Complex* (MHC), wobei besonders HLA-II-Moleküle einen stärkeren Einfluss auf UC als auf CD zu haben scheinen [13]. Die genannten genetischen Faktoren sind nur einige Beispiele der vielen molekularen Veränderungen in der CED-Pathogenese. Auch Umwelteinflüsse und Lebensstilfaktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von CED. Dabei gelten für UC das Rauchen sowie eine Appendektomie nach stattgehabter Appendizitis als protektive Faktoren, wobei diese eine negative Beeinflussung auf CD ausüben [14]. Als weitere Risikofaktoren für die CED-Entwicklung gelten die Darmflora [15], eine westliche, kohlenhydrat- und fettreiche Ernährung, nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR), Kontrazeptiva, Antibiotikaeinnahmen in der Kindheit sowie ein Vitamin-D-Mangel [14]. Abgesehen von genetischen Faktoren, haben auch epigenetische Aspekte, wie die Regulation der Geneexpression ohne Veränderung des Genoms (DNA-Methylierung, Histon-Modifikation, miRNAs) einen hohen Stellenwert in der Ätiopathogenese der CED [16]. MiRNAs stellen dabei den primären Fokus dar, auf welchen ich im Rahmen dieser Arbeit noch ausführlicher eingehen werde.

1.1.2. Klinik

Beide Krankheiten präsentieren sehr heterogene Krankheitsbilder und zeigen variable Symptome, je nach Lokalisation, Verhalten und Schweregrad der Erkrankung [17]. In diesem Abschnitt werde ich kurz auf die wichtigsten klinisch-pathologischen Aspekte eingehen und einen groben Überblick über die Komplexität der CED geben.

Den CED liegt nach aktuellen Erkenntnissen eine Darmbarrierestörung gegenüber Bakterien mit der Folge einer pathologisch gesteigerten Immunreaktion und der Ausbildung lokaler Gewebsschädigungen zugrunde [18]. CD ist häufig durch krampfartige Abdominalschmerzen, nicht selten im rechtsseitigen Unterbauch lokalisiert und ggf. mit subfebrilen Temperaturen, meist einhergehend mit Durchfällen, charakterisiert. Neben den gastrointestinalen (GI) Symptomen

sind extraintestinale Manifestationen nicht selten und häufig ein Zeichen der systemischen inflammatorischen Aktivität. Zu den Komplikationen zählen Fissuren, Fisteln und anorektale Abszesse, segmentale Stenosen und Konglomerattumore, Malabsorptionssyndrome mit Gewichtsverlust, sowie extraintestinale Symptome, wie beispielsweise Erythemata nodosa oder Arthritiden. Histopathologisch typisch ist für CD die diskontinuierliche, segmentale, transmurale Entzündung des gesamten Gastrointestinaltraktes, welche besonders häufig das terminale Ileum und das proximale Kolon betrifft, jedoch theoretisch vom Mund bis zum Anus auftreten kann. In der Histologie finden sich klassischerweise Epithelzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen, eine lymphozytäre Hyperplasie, Lymphangiektasien und aphtenähnliche Geschwüre der Schleimhaut [19]. Differentialdiagnostisch zur CD kann bei einer Beteiligung des terminalen Ileums eine UC-bedingte *backwash* Ileitis vorliegen [20]. In etwa 10% der Fälle kann, trotz klinischer und histologischer Untersuchung, nicht zwischen CD und UC differenziert werden, was dann als Colitis indeterminata (CI) bezeichnet wird [21].

Leitsymptome der Colitis ulcerosa sind blutig-schleimige Durchfälle und meist linksseitig lokalisierte, krampfartige Abdominalschmerzen vor der Defäkation, sogenannte Tenesmen. Zu den Komplikationen zählen massive Blutungen, ein toxisches Megakolon sowie ein erhöhtes Risiko für ein kolorektales Karzinom (KRK), welches mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung und der Dauer der Erkrankung korreliert. Es können zudem ebenfalls extraintestinale Symptome bzw. assoziierte Erkrankungen, wie eine Arthritis, ein Erythema nodosum und eine primär sklerosierende Cholangitis (PSC) auftreten. Die UC breitet sich kontinuierlich von distal nach proximal über das Rektum und Kolon aus. Sowohl für die Therapie als auch für die Krebsvorsorge, ist eine Einteilung, je nach Ausdehnung der Erkrankung, in eine Proktitis, eine Linksseitenkolitis und eine ausgedehnte Kolitis sinnvoll [22]. Bei der Koloskopie fallen typischerweise eine gerötete und geschwollene Schleimhaut mit Kontaktblutungen und punktförmigen Schleimhautulzera auf. Im histologischen Bild wird die oberflächliche Schleimhautentzündung überwiegend von Lymphozyten und Histozyten infiltriert und es kommt zu einem Becherzellverlust. In fortgeschrittenen Stadien können sich Schleimhautatrophien, Kryptenabszesse, Pseudopolypen und Epitheldysplasien, welche als Vorläufer einer karzinomatösen Entartung gelten, ausbilden [22]. Ein negativer prognostischer Faktor für den Verlauf dieser meist chronisch-rezidivierend, seltener chronisch-kontinuierlich oder akut-fulminant verlaufenden Erkrankung, ist beispielsweise eine ausgeprägte Kolitis. Diese kann in manchen Fällen zur Kolektomie führen [23].

1.1.3. Diagnostik

Es gibt eine Reihe wichtiger diagnostischer Methoden für CED. Die Endoskopie mit Biopsien ist unverändert der Goldstandard, sowohl in der Diagnostik als auch in der Überwachung von Patienten mit CED [24]. Je nach Ausdehnung der Kolitis sollten Überwachungskoloskopien ab dem achten bis 15. Jahr nach Erstdiagnose ein- bis zweijährlich erfolgen [19,22]. Nichtsdestotrotz bleibt die Evaluierung der Krankheitsaktivität und die Definition der Mukosaheilung mithilfe eines effizienten endoskopischen Scores eine Herausforderung [25]. Die Endoskopie birgt außerdem viele praktische Limitationen sowie potentielle, wenn auch seltene, ernsthafte Komplikationen. Nur am Rande erwähnt seien hier mögliche Perforationen, Blutungen, die Kosten eines Eingriffs, die notwendige Darmreinigung sowie Sedierungskomplikationen [26]. Obwohl bildgebende Verfahren eine akkurate und verlässliche Technik für die Diagnostik, die Schweregradeinteilung und die Überwachung des Krankheitsverlaufs darstellen [27], gibt es aktuell noch keine einheitliche Definition für die Schweregradeinteilung der CED [28]. Serologische Marker wie der CRP-Wert und die BSG, sind zwar bewährt und günstig, jedoch nicht ausreichend spezifisch für eine angemessene Überwachung des Krankheitsverlaufs [29]. Zur standardisierten CED-Phänotypisierung wurde die Montreal-Klassifikation entwickelt. Sie teilt CD nach dem Manifestationsalter (A1-3), der Lokalisation (L1-4) und dem biologischen Verhalten (B1-3) und UC nach dem Ausmaß (E1-3) und der Schwere der Erkrankung (S0-3) ein [30,31]. Die Krankheitsaktivität wird für CD anhand des *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI) eingeteilt [19]; als Aktivitätsindex für UC findet der Mayo-Score Anwendung [22].

1.1.4. Therapie

Neben konservativen Therapiemaßnahmen, wie einer Diät bei Unverträglichkeiten oder einem Rauchverzicht bei CD, steht bei CED die medikamentöse Therapie im Vordergrund. Zur Remissionsinduktion werden, abhängig von der Erkrankung und Schwere, zahlreiche Medikamente eingesetzt. Hierbei handelt es sich beispielsweise um 5-ASA-Präparate, wie Sulfasalazin und Mesalazin, Kortikosteroide, wie Budenosid und Prednisolon, den Folsäure-Antagonisten Methotrexat, Immunsuppressiva, wie Azathioprin und Ciclosporin A, und Biologicals, wie die TNF α -Antikörper Infliximab oder Adalimumab. Die Remissionserhaltung erfolgt bei CD-Patienten beispielsweise als Dauertherapie mit Azathioprin, bei unzureichender

Wirksamkeit auch in Kombination mit TNF α -Antikörpern. Dabei sollte jedoch, aufgrund des höheren Nebenwirkungsprofils, längerfristig eine Monotherapie angestrebt werden [19]. Eine neuere Therapiemöglichkeit bei mittelschwerer bis schwerer Erkrankung und unzureichendem Ansprechen auf die zuvor genannten Therapieoptionen stellt der humanisierte monoklonale Antikörper Vedolizumab dar. Er blockiert hochselektiv das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, sodass eine Einwanderung von aktivierten Lymphozyten in den Darm verhindert wird [32,33]. Prädestiniert für ein Rezidiv dieser schubförmig verlaufenden Erkrankung sind insbesondere junge Patienten mit einem Befall des Dünndarms, ggf. mit Strikturen, welche nicht selten eine Operationsindikation darstellen [23]. Die interventionelle Endoskopie mittels Ballondilatation stenosierter Darmabschnitte und der Verschluss von Fisteln stellen weitere Therapiemöglichkeiten bei CD dar [19]. Eine Indikation zur chirurgischen Intervention ist aber Komplikationen vorbehalten. Die Ultima Ratio beim Therapieversagen einer UC ist eine Proktokolektomie, durch welche die Erkrankung geheilt werden kann, was bei CD derzeit noch nicht möglich ist. Aufgrund der Vergesellschaftung von CED mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung eines KRK [34–36] sind regelmäßige Kontroll-Koloskopien erforderlich. Speziell bei UC ist die Dauertherapie mit Mesalazin mit einer Reduktion des KRK-Risikos assoziiert [22]. Mit neuen Erkenntnissen ist zunehmend klargeworden, dass nicht, wie früher angenommen, die klinischen Symptome, sondern die Mukosaheilung mit den besten langfristigen Therapiezielen und einer besseren Prognose assoziiert ist. Dazu zählt, neben der Normalisierung der Lebensqualität, eine langfristige steroidfreie Remission [37,38].

1.2. Biomarker

Die Technologie des Hochdurchsatz-Screenings für biochemische, pharmakologische und genetische Untersuchungen ermöglicht die Entdeckung neuer Biomarker. Als Biomarker bezeichnet man einen Indikator eines physiologischen oder pathologischen Prozesses im Körper oder auch ein pharmakologisches Ansprechen auf eine therapeutische Intervention, welcher objektiv gemessen werden kann. Biomarker haben das Potential, Krankheiten früher zu erkennen und ineffektive experimentelle Behandlungen zu reduzieren [39]. Der Begriff Biomarker wurde erstmals 1980 verwendet [40]. Sein Gebrauch geht mit einem früheren Informationserhalt und einer schnell verfügbaren, nicht-invasiven und kostengünstigeren Durchführung als bei herkömmlichen Screening-Untersuchungen üblich, einher und ist dadurch akzeptabler für den

Patienten. Wichtig zur Bewertung eines Biomarkers ist neben der Einschätzung seiner Spezifität und Sensitivität auch die Untersuchung seiner Herkunft und Stabilität im untersuchten Medium. Des Weiteren sollte er robust und unabhängig validierbar sein [41]. Entstehende Biomarker in CED, wie ASCA/pANCA und eine Reihe von Zytokinen und Chemokinen sind jedoch nicht ausreichend sensitiv oder spezifisch, um standardisierte klinische Beurteilungen zu ersetzen [42]. Andere Neutrophilen-Produkte, wie Lactoferrin, die Myeloperoxidase, die PMN-Elastase und Lysozym, korrelieren mit der intestinalen Entzündungsaktivität, unterscheiden sich allerdings ebenfalls in Sensitivität und Spezifität [42]. Trotz allen Fortschrittes ist in CED bisher kein Biomarker verlässlich genug, um bei einem positiven Testergebnis auf eine Koloskopie mit der Möglichkeit, die endoskopische Aktivität zu beurteilen, zu verzichten. Vielmehr werden sie bisher ergänzend angewandt [29].

1.3. Fäkales Calprotectin als bestuntersuchter Biomarker in CED

Als Marker der Mukosaheilung wird zunehmend das fäkale Granulozyten-Markerprotein Calprotectin (FC) bei CED-Patienten eingesetzt [43–45]. Die FC-Konzentration korreliert signifikant mit der endoskopischen CED-Erkrankungsaktivität und eignet sich daher für die Einschätzung der CED-Entzündungsaktivität [46,47]. Bei CD und reinem Dünndarbefall ist FC jedoch häufig negativ [19]. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Kawashima et al. wurde gezeigt, dass FC eine Remission in CD deutlich genauer anzeigt als serologische Marker wie CRP, Albumin, Leukozyten- und Thrombozytenzahl [48]. Tatsächlich ist FC aktuell einer der wenigen Biomarker, der in der Klinik Anwendung findet. Was er als unspezifischer Erkrankungsmarker jedoch nicht kann, ist die Differenzierung von CD und UC. Des Weiteren ist keine Unterscheidung zwischen aktiver CED-Erkrankung und anderen infektiösen gastrointestinalen Erkrankungen oder der Entstehung von Präneoplasien möglich [49]. FC besitzt daher zwar nur einen eingeschränkten Nutzen in der Primärdiagnostik, eignet sich jedoch gut in der Unterscheidung von CED zu funktionellen Beschwerden, in der pädiatrischen Diagnostik sowie in der Früherkennung von Rezidiven [19,22]. Aus diesem Grund gibt es weiterhin einen Bedarf und ein kollektives Interesse an der Erforschung und Erprobung neuer Biomarker, wie den in dieser Arbeit behandelten miRNAs, für die CED-Diagnostik und -Differenzierung sowie für die Einschätzung der Erkrankungsaktivität.

1.4. MicroRNA

Im folgenden Abschnitt wird die Biogenese und Funktion von miRNAs beschrieben und auf ihre mögliche Funktion als diagnostische Biomarker hingewiesen.

1.4.1. miRNA-Biogenese

MiRNAs sind kleine, etwa 22 Nukleotide lange, hochkonservierte, nichtkodierende RNAs, welche zahlreiche Prozesse in der Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene, wie das Gen-Silencing, regulieren [50]. Sie wurden erstmals 1993 beschrieben, als die Regulation des heterochronen Zielgens *lin-14* durch die miRNA *lin-4* in der Nematode *Caenorhabditis elegans* festgestellt wurde [51,52]. Die Biogenese von miRNAs (

Abb. 1) beginnt im Zellkern mit der Transkription vom Genom, meist durch die RNA-Polymerase-II, seltener durch die RNA-Polymerase-III, wobei das Primärtranskript, die sogenannte *primary miRNA* (pri-miRNA) entsteht [50]. Diese hat eine Länge von mehreren hundert bis wenigen tausend Nukleotiden, sowie einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende und ein 7-Methylguanosin-Cap am 5'-Ende und lagert sich zu einer Schleife (*stem-loop structure*) zusammen [50,53]. Der Mikroprozessor-Komplex, bestehend aus der RNase III (*Drosha*) und dem RNA-Bindeprotein *DiGeorge Syndrom critical region gene 8* (DGCR8), spaltet die pri-miRNA in die etwa 70 Nukleotide lange *precursor miRNA* (pre-miRNA) [50]. Die pre-miRNA formt sich zu einer Haarnadelstruktur (*hairpin*) und wird über Exportin-5 mit dem Kofaktor Ran-GTP aktiv ins Zytoplasma geschleust [50,53]. Hier wird die pre-miRNA durch das RNase III-Enzym *Dicer* zusammen mit dem doppelsträngigen RNA-Bindeprotein TRBP2 (*trans-activation response RNA-binding protein*) zunächst in eine 17 bis 24 Nukleotide lange doppelsträngige miRNA geschnitten, danach entwunden und in Einzelstränge gespalten [50,53]. Ein reifer Strang wird dann Teil des *miRNA-induced silencing complex* (miRISC), welcher sich aus RNA-Bindeproteinen der Argonaut-Familie zusammensetzt [50,53]. MiRNAs regulieren die Genexpression über die Basenpaarung mit der Ziel-mRNA [53]. Die Regulierung der Aktivität der Zielgene erfolgt je nach RNA-Bindeprotein der Argonaut-Familie sowie anhand des Grades der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA. Ist AGO2 im miRISC-Komplex enthalten, kommt es durch ein Zerschneiden zur Degradierung der Ziel-mRNA und es resultiert die sogenannte RNA-Interferenz. AGO2 wirkt dabei möglicherweise als Katalysator der miRISC-Aktivität [50,54]. Bei einer Zusammensetzung aus AGO1, AGO3 oder AGO4 kommt es eher zur

Translationshemmung und/oder Deadenylierung des Transkripts. MiRNAs binden an der 3'-Region der Zielgen-mRNA und verursachen bei exakter Basenpaarung eine Degradierung der jeweiligen mRNA. Anders wirkt sich eine nur partielle Bindung zwischen miRNA und mRNA aus, welche zu einer Translationshemmung und Destabilisierung der Ziel-mRNA führt [54]. Veränderungen der mRNA-Konzentration verdeutlichen den Einfluss von miRNAs auf die Gen-Expression, da eine durch die miRNA destabilisierte Ziel-mRNA zu einer verminderten Proteinsynthese führt [55]. Neben diesem klassischen Weg der miRNA-Biogenese erscheinen in letzter Zeit neue Berichte über Regulationen auf unterschiedlichen Ebenen und alternativen Biogenesewegen, welche teilweise unabhängig von Dicer oder Drosha verlaufen können [56].

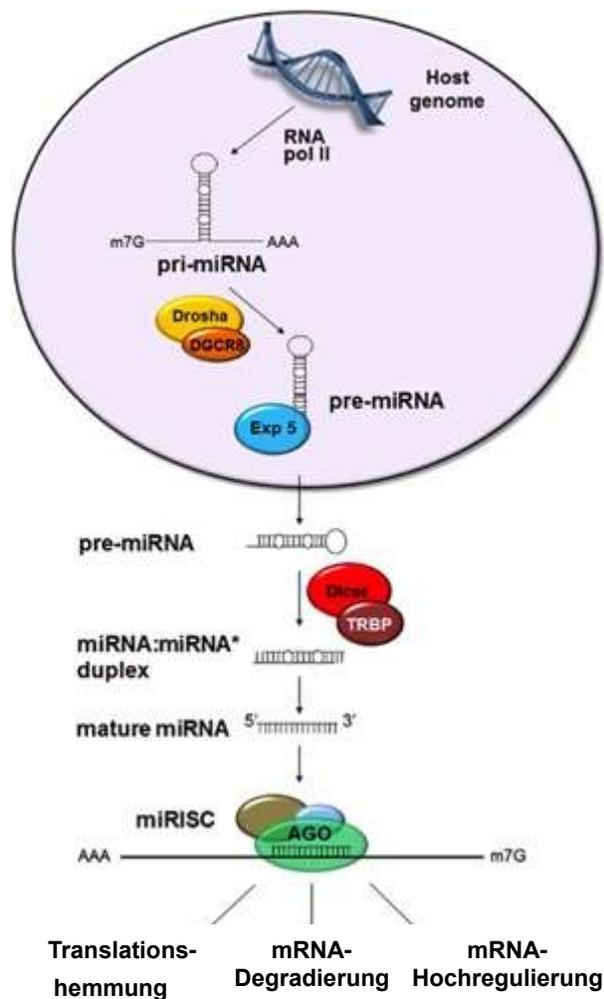


Abb. 1: miRNA-Biogenese (in Anlehnung an [57]).

1.4.2. Funktion von miRNAs

Laut der 21. Version der miRBase Datenbank gibt es aktuell 2585 verschiedene reife humane miRNAs (hsa-mir) [58]. Die einzelnen miRNAs können je nach Literaturangabe etwa 30% [54,59] bis über 60% [60] aller Protein-kodierenden Gene mit den verschiedensten Mechanismen regulieren. Aufgrund hoher Ähnlichkeiten und Bindungen an verschiedenen Sequenzen der mRNA kann jede einzelne miRNA theoretisch multiple Ziel-mRNAs ansteuern und wiederum eine mRNA von mehreren miRNAs reguliert werden [53].

Neben der miRNA-Funktion der Translationshemmung wurde ebenso der Mechanismus der Translationsaktivierung beschrieben [61]. Ziel-mRNAs können beim Zellzyklusarrest durch miRNAs translational hochreguliert werden, während in proliferierenden Zellen eine Translationshemmung induziert wird [62]. Es wurde gezeigt, dass miRNAs im Komplex mit dem *Argonaute-like Gene 1* (ALG-1) ebenfalls nicht-kodierende RNAs (ncRNA), welche als Substrate für die miRNA-Prozessierung in *Caenorhabditis elegans* dienen, ansteuern und regulieren können [63]. Darüber hinaus konnte in einer Studie von Tang et al. im Mausmodell nachgewiesen werden, dass eine miRNA die Biogenese einer anderen miRNA kontrollieren kann, indem sie direkt ihr Primärtranskript im Zellkern zum Ziel hat [64]. Eine Interaktion zellulärer miRNAs mit der Promotorregion TATA-Box kann zu einer Hochregulierung der Transkription führen [65]. Weitere Studien haben ergeben, dass miRNAs die Protein-Synthese durch die Etablierung eines Schwellenwerts an Ziel-mRNAs regulieren können und somit nicht nur als Ein- und Ausschalter, sondern auch als Feinregulierer der Genexpression wirken können [66]. Dysregulationen der intestinalen Entzündungsreaktion könnten durch eine Störung der Balance zwischen miRNA-Aktivität und Schwellenwert von spezifischen Ziel-mRNAs, wie zum Beispiel Gene mit wichtigen Funktionen in der intestinalen Homöostase, hervorgerufen werden und zu inadäquater Genexpression und Krankheit führen [67].

MiRNAs unterliegen, ähnlich wie RNAs, einer Regulierung durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen [68]. Sie spielen eine wichtige Rolle bei allen zellulären Prozessen, wie z.B. in der Zellproliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung [69] sowie in Entzündungsprozessen und der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen [70]. Es ist ebenso bekannt, dass miRNAs bei der Karzinogenese involviert sind [59,71–73] und als Onkogene und Tumorsuppressoren wirken können [74].

1.4.3. miRNAs als Biomarker

Das Gebiet der miRNA-Forschung wächst derzeit rasant und die miRNA-bezogenen Publikationen steigen fast exponentiell an, ebenso im Zusammenhang mit gastroenterologischen Themen wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Dem zugrunde liegt die wachsende Kenntnis der Bedeutung von miRNAs im Immunsystem und ihrer veränderten Expression in immun-vermittelten Erkrankungen [16]. Von besonderem Interesse ist die Einschätzung ihrer Eignung als potentielle diagnostische Biomarker [5,75–77].

Bisherige Kenntnisse über miRNAs lassen auf eine hohe Stabilität im natürlichen Umfeld schließen [71,72], da sie sich relativ resistent gegenüber Hitze, Trocknung, Lagerung und Formalinfixierung gezeigt haben [78]. Durch das ubiquitäre Vorkommen von miRNAs in Körperflüssigkeiten stellt sich die Materialgewinnung, im Vergleich zu einer Untersuchung wie der Endoskopie mit Biopsie-Entnahme, weniger aufwendig dar. MiRNAs konnten zum Beispiel in Speichel, Muttermilch, Tränen, Peritoneal- und Pleuraflüssigkeit, im Liquor, Urin und Stuhl nachgewiesen werden [79]. Das präferierte Medium für den Einsatz eines nicht-invasiven Biomarkers ist bisher das Blut, da es schnell verfügbar und leicht zu Händeln ist und sich globale molekulare Veränderungen im Körper potentiell hierin zeigen [41,80].

1.5. miRNAs in CED

Bisherige Erkenntnisse über miRNAs in CED beruhen auf Studien, welche die miRNA-Expression im Gewebe und im Blut untersuchten.

1.5.1. miRNA-Expression im Gewebe von CED-Patienten

Wu et al. wiesen erstmals Expressionsveränderungen in Gewebeproben von UC-Patienten [81] und anschließend auch in Gewebeproben von CD-Patienten nach, wobei Expressionsunterschiede zwischen Patienten mit Manifestationen im Ileum und im Kolon festgestellt wurden [82]. Fasseu et al. konnten nachweisen, dass veränderte miRNA-Expressionen auch in inaktiver Mukosa von CED-Patienten vorliegen und lassen vermuten, dass miRNAs zur Anfälligkeit für CED beitragen könnten [83]. Schaefer et al. untersuchten Gewebe, Blut und Speichel von CED-Patienten und stellten die Hypothese auf, dass spezifisch veränderte miRNA-Expressionsmuster für CD und UC vorliegen [84]. Zwiers et al. fanden heraus, dass zwei bestimmte miRNAs (Let-7e und Let-7f)

Einfluss auf die Dysregulation der IL-23R-Signalkaskade in CED zu haben scheinen [85]. Koukos et al. beobachteten, dass reduzierte Konzentrationen von miR-124 im Kolongewebe von Kindern mit aktiver UC-Erkrankung, mit einer erhöhten Expression und Aktivität von STAT3 einhergehen, was zur Entzündung und Pathogenese der UC in Kindern beitragen könnte [86]. In einer Studie von Lewis et al. wurde herausgefunden, dass Dysplasien bei UC mit einer veränderten miRNA-Expression in der Mukosa einhergehen. Insbesondere wurde eine erhöhte miR-200b-3p-Expression beobachtet. Diese Expressionsveränderungen wurden weder in entzündlichen Polypen noch im Serum nachgewiesen [87]. In einer Ultra-Hochdurchsatz-Sequenzierung im Jahr 2010 wurde das gesamte miRNA-Transkriptom des intestinalen Epithels von Mäusen determiniert. Mithilfe von *Dicer1*-defizienten Mäusen wurden die Auswirkungen des Fehlens aller miRNAs im Mäusedarm beobachtet. Es zeigte sich eine Reduktion von Becherzellen im Kolon, eine Zunahme der Apoptose in den Krypten und eine intestinale Entzündung. Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, dass miRNAs eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Funktion des intestinalen Epithels spielen [88].

1.5.2. miRNA-Expression im Blut von CED-Patienten

Die Arbeitsgruppe von Wu et al. untersuchte insgesamt 55 Blutproben von aktiven und inaktiven CD- und UC-Patienten sowie von gesunden Kontrollen mittels miRNA-Microarray. Diese Studie erbrachte den ersten Nachweis, dass miRNAs aus Blutproben zwischen CED-Subtypen und gesunden Kontrollen unterscheiden können. Es wurden insgesamt zehn erhöhte und eine erniedrigte miRNA in Blutproben von aktiven UC-Patienten im Vergleich zu CD-Patienten identifiziert. Zwölf miRNAs waren bei der Gegenüberstellung von aktiven UC-Blutproben und gesunden Kontrollen signifikant erhöht und eine erniedrigt. Für aktive CD-Patienten wurden fünf erhöhte und zwei erniedrigte miRNAs im Vergleich zu den gesunden Proben identifiziert. Fünf miRNAs (miR-199a-5p, -362-3p, -340*, -532-3p und miRplus-1271) zeigten eine Überexpression für sowohl aktive CD- als auch aktive UC-Patienten, was Ausdruck einer generalisierten Entzündung sein könnte. Dass die in dieser Studie identifizierten miRNAs sich jedoch bis auf die miR-199a-5p nicht mit miRNAs überschneiden, die in einer Studie zu SLE-assoziierten PBMC überexprimiert waren, lässt vermuten, dass bestimmte Autoimmunerkrankungen mit spezifischen miRNA-Expressionsmustern assoziiert sein könnten [80]. Paraskevi et al. führten eine Studie mit Blutproben von 128 CD- und 88 UC-Patienten sowie

162 Blutproben von Gesunden durch und untersuchten die Expression von 20 miRNAs. Die Auswahl der untersuchten miRNAs wurde basierend auf den Ergebnissen von Wu et al. [80] getroffen. Elf untersuchte miRNAs, darunter miR-16, zeigten eine signifikant höhere Expression in CD-Proben im Vergleich zu den gesunden Proben. Bei den UC-Proben wurden sechs miRNAs höher als in den gesunden Proben exprimiert. Dazu gehörten miR-16, miR-21 und miR-155, wobei Letztere interessanterweise die höchste Expression aufwies [77]. Neben Studien zur miRNA-Expression im Vollblut liegen ebenso Daten zu Expressionsveränderungen im Serum von CED-Patienten vor. Ergebnisse dieser Studien werden im Diskussionsteil der Arbeit in Zusammenschau mit unseren Resultaten erläutert und diskutiert.

1.5.3. miRNA-Expression im Stuhl von CED-Patienten

Bis heute wurde die Frage zu miRNA-Veränderungen im Stuhl von CED Patienten noch nicht ausreichend untersucht. Ahmed et al. untersuchten im Jahr 2009 primär die miRNA-Veränderungen im Stuhl von Patienten mit KRK und nutzten dabei Proben von CED-Patienten als eine der Vergleichsgruppen [89]. Die Daten dieser Studie deuten auf potentielle Unterschiede der miRNA-Expression im Stuhl von CED-Patienten hin, auch wenn die Studie einige methodologische Limitationen aufweist [89]. Die Arbeiten aus der Gruppe von Link et al. haben die Erkenntnisse zur miRNA-Expression im Stuhl in einer Reihe von Untersuchungen vertiefen können, auch wenn es noch viele unbeantwortete Fragen gibt. So konnte gezeigt werden, dass die miRNA-Expression im Stuhl eine hohe Stabilität aufweist und eine unabhängige Messung reproduzierbare Ergebnisse liefert [41,90]. Zumindest für die Stuhlproben von KRK- und Pankreaskarzinom-Patienten konnten veränderte miRNA-Expressionen demonstriert werden [90–93]. Kürzlich wurde eine weitere Arbeit zu einer neuartigen miRNA-Funktion publiziert. So wurde vermutet, dass eine physiologische Rolle der fäkalen miRNA die Gestaltung der Wirts-Darmflora beinhaltet, indem sie in Bakterien eintreten und so über die Genregulation deren Wachstum beeinflussen können. Hauptquellen der fäkalen miRNA sind demnach Darmepithelzellen und Hopx-positive Zellen. Bei *Dicer*-ausgeknockten Mäusen zeigte sich eine unkontrollierte Darmflora und die Entwicklung einer exazerbierten Kolitis, wohingegen in Wildtyp-Mäusen eine Transplantation fäkaler miRNA zu einer wiederhergestellten Darmflora und einer Besserung der Colitis führte. Fäkale miRNAs scheinen daher essentiell für die Erhaltung einer normalen Darmflora zu sein und gelten somit als natürliche Stuhlbestandteile. Dies könnte

möglicherweise in Zukunft als potentielle Strategie für die Manipulation der Darmflora genutzt werden [94].

1.6. Fragestellung der Arbeit

Bislang stellt die Endoskopie als invasive Methode den Goldstandard in der Diagnostik der CED dar. Invasive Screening-Tests sind jedoch teuer, bergen Risiken für den Patienten und führen deshalb zu schlechter Compliance [41]. Daher besteht die Notwendigkeit für nichtinvasive Biomarker in CED, welche eine klinische Remission und vor allem eine mukosale Heilung widerspiegeln sowie weiterhin möglicherweise das Risiko für eine Neoplasieentstehung vorhersagen können.

In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass miRNAs in CED häufig veränderte Expressionen aufzeigen. Wir haben uns die Frage gestellt, ob sich miRNAs im Stuhl von CED-Patienten als neue nicht-invasive Biomarker eignen könnten. Hierzu fehlen bisher ausreichende Untersuchungen. Zentrale Punkte unserer Konzeptstudie waren die Herausarbeitung der miRNA-Expressionen im Stuhl, der Vergleich zur Aktivität im Serum und die Identifikation möglicher Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression.

1.7. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Machbarkeitsstudie war die Evaluierung des Potentials von fäkalen miRNAs als Biomarker für Patienten mit CED und der Vergleich dieser Daten mit zirkulierenden miRNAs, FC und CRP.

Folgende Aspekte wurden untersucht:

- Charakterisierung der miRNA-Expression (miR-16, miR-21, miR-155, miR-223) in Serum und Stuhl von CED-Patienten in Abhängigkeit von der Erkrankung und der Erkrankungsaktivität
- Korrelation der miRNA-Expression mit dem CRP-Wert und mit FC
- Untersuchung der miRNA-Expression in verschiedenen Stuhlmengen
- Untersuchung des Einflusses von Vollblut und Serum auf die miRNA-Expression im

Stuhl

- Untersuchung der Temperaturstabilität der miRNA-Expression im Stuhl

2. Material und Methoden

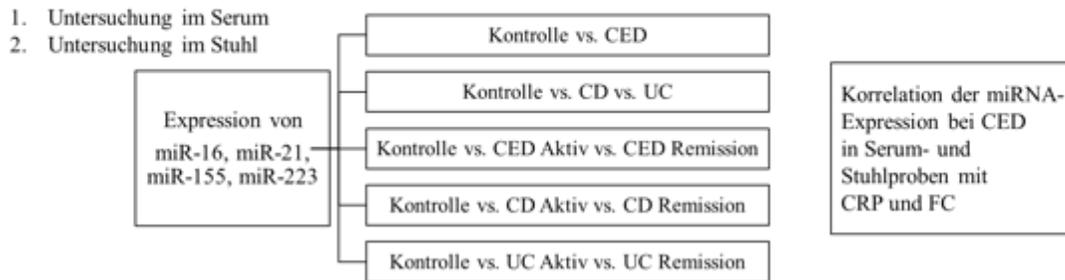
Im folgenden Kapitel werden die Patienten charakterisiert, das Studiendesign vorgestellt und die durchgeführten Methoden sowie die statistische Analyse erläutert.

2.1. Ethik und Patienten

Diese Arbeit wurde als ein Teil der Studie zur Beurteilung von miRNAs als Biomarker in gastrointestinalen Erkrankungen in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg unter Leitung von PD Dr. med. habil. Alexander Link durchgeführt. Die Studie wurde entsprechend der WMA „*Declaration of Helsinki – Ethical Principles for medical research involving human subjects*“ durchgeführt. Die Zustimmung für das Studienprotokoll wurde durch die lokale institutionelle Prüfungskommission der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg erteilt (Nummer 99/10 und Nummer 42/08) [95]. Die Studie bestand aus zwei Studienarmen, nämlich einer retrospektiven Analyse von bereits zur Verfügung stehenden Proben von CED-Patienten und Kontrollen sowie aus Proben, welche prospektiv gesammelt wurden. Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von jedem Patienten aus dem prospektiven Arm vor der Probensammlung eingeholt. Die Kontrollgruppe bestand aus Proben von Patienten mit dyspeptischen Beschwerden ohne Hinweis auf CED, welche im Rahmen von anderen Studien/Analysen gesammelt wurden.

2.2. Studiendesign

1. miRNA-Expression in Serum und Stuhl von CED-Patienten



2. Untersuchung potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression

<p>1. miRNA-Expression im Stuhl in verschiedenen Extraktionsmengen</p> <ul style="list-style-type: none"> • 25µl • 50µl • 100µl 	<p>2. Einfluss von EDTA-Blut auf die miRNA-Expression im Stuhl</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100% Stuhl • 90% Stuhl zu 10% Blut • 50% Stuhl zu 50% Blut • 100% Blut 	<p>3. Einfluss von Serum auf die miRNA-Expression im Stuhl</p> <ul style="list-style-type: none"> • 100% Stuhl • 50% Stuhl zu 50% Serum • 100% Serum 	<p>4. miRNA-Expression im Stuhl bei verschiedenen Lagerungstemperaturen</p> <ul style="list-style-type: none"> • -80°C • -80°C, nach 24h -30°C • -30°C • 4°C • 20°C
--	--	---	--

Abb. 2: Studiendesign.

2.3. Charakterisierung von CED-Patienten

Insgesamt wurden 36 Serumproben von Patienten mit Morbus Crohn (18 weibliche (davon eine Doppelbestimmung) und 17 männliche; mittleres Alter: 36,6 (21-68 Jahre); davon 20 Aktiv und 16 in Remission) und 15 Serumproben von Patienten mit Colitis ulcerosa (acht weibliche und sieben männliche; mittleres Alter: 44,4 (20-77 Jahre); davon acht Aktiv und sieben in Remission) eingeschlossen und analysiert. Dies entspricht einer Anzahl von 51 CED-Serumproben, wovon 28 Serumproben von aktiv Erkrankten und 23 Serumproben von Patienten in Remission stammen.

Es wurden zudem 39 Stuhlproben von CD-Patienten (20 weibliche und 19 männliche; mittleres Alter: 36,6 (21-68 Jahre); davon 26 Aktiv und 13 in Remission) und 18 Stuhlproben von UC-Patienten (zehn weibliche und acht männliche; mittleres Alter: 44,9 (20-77 Jahre); davon zehn Aktiv und acht in Remission) untersucht. Dementsprechend erfolgte eine Analyse von insgesamt 57 CED-Stuhlproben, wobei es sich um 36 Stuhlproben von aktiv erkrankten Patienten und um 21 Stuhlproben von Patienten in Remission handelt.

In die Kohorte der CD-Stuhlproben wurden zwei Proben von Patienten mit Colitis indeterminata eingeschlossen. Die Proben wurden bei einer Temperatur von -30°C gelagert. Als Kontrollproben

dienten 20 Serumproben (elf weibliche und neun männliche Probanden; mittleres Alter: 57,4 (31-78 Jahre)) und 15 Stuhlproben (zehn weibliche und fünf männliche Probanden; mittleres Alter: 53,5 (28-78 Jahre)). Die Charakterisierung des Patientenkollektivs ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: CED-Probanden.

Beschreibung der Studienkohorte		Gesamt	CD	UC	Kontrollen
Gesamt	Probanden (n, %)	96 (100%)	43 (44,8%)	18 (18,8%)	35 (36,5%)
	Geschlecht (w/m)	53/43	22/21	10/8	21/14
	Alter (MW \pm SD)	45,1 \pm 16,2	36,5 \pm 12	44,9 \pm 15,8	55,7 \pm 15
Medikation ¹	Kortikosteroide	20	15	5	
	Azathioprin	25	20	5	
	5-ASA	32	17	15	
	Methotrexat	3	2	1	
	TNF- α Blocker	9	6	3	
Serum	Probanden (n, %)	70 (100%)	35 (50%) ²	15 (21,4%)	20 (28,6%)
	Geschlecht (w/m)	37/33	18/17	8/7	11/9
	Alter (MW \pm SD)	44,2 \pm 15,9	36,6 \pm 12,3	44,4 \pm 15,2	57,4 \pm 13,7
	FC (μ g/g) (MW \pm SD)	92 \pm 100,8	80,9 \pm 84,6	109,8 \pm 123,5	
	CRP (mg/l) (MW \pm SD)	26,3 \pm 43,9	28,9 \pm 48,7	16,4 \pm 13,4	
Stuhl	Probanden (n, %)	72 (100%)	39 (54,2%)	18 (25%)	15 (20,8%)
	Geschlecht (w/m)	40/32	20/19	10/8	10/5
	Alter (MW \pm SD)	42,2 \pm 15,5	36,6 \pm 12,2	44,9 \pm 15,8	53,5 \pm 16,8
	FC (μ g/g) (MW \pm SD)	89,8 \pm 100,5	77,7 \pm 84,3	109,8 \pm 123,5	
	CRP (mg/l) (MW \pm SD)	25,1 \pm 35,1	28,7 \pm 39,2	14,2 \pm 12,5	
Aktiv ³	Probanden (n, %)	38 (100%)	28 (73,7%)	10 (26,3%)	
	Geschlecht (w/m)	21/17	15/13	6/4	
	Alter (MW \pm SD)	36,5 \pm 12,6	34 \pm 9,3	43,4 \pm 17,9	
Remission ³	Probanden (n, %)	23 (100%)	15 (65,2%) ²	8 (34,8%)	
	Geschlecht (w/m)	11/12	7/8	4/4	
	Alter (MW \pm SD)	43,2 \pm 14,4	41,3 \pm 15	46,9 \pm 13,6	
Lokalisation ⁴	L1 (Dünndarm)		8		
	L2 (Dickdarm)		14		
	L3 (Dünn- und Dickdarm)		14		
	L4 (Oberer GI-Trakt)		2		
	E1 (Rektum)			1	
	E2 (Linksseitiges Kolon)			2	
	E3 (Gesamtes Kolon)			2	

¹ Systematisch erfasst für n=47.

² Enthält eine Doppelbestimmung (entspricht insgesamt 35 Probanden (20 Aktiv, 15 in Remission), jedoch 36 Proben (20 Aktiv, 16 in Remission)).

³ Enthält Probanden mit Stuhl- und Serumproben; die Probenanzahl der verschiedenen Untersuchungen ist dem Abschnitt 2.3 oder der jeweiligen Abbildungsbeschriftung zu entnehmen.

⁴ Systematisch erfasst (Montreal-Klassifikation) für n=43.

2.4. CED-Erkrankungsaktivität und -Diagnose

CD-Patienten wurden anhand des Crohn's Disease Activity Index CDAI (cut-off <150) in Patienten mit aktiver Erkrankung und Patienten in Remission unterteilt. Patienten mit UC wurden in Subgruppen mit aktiver Erkrankung und Remission, basierend auf dem Mayo-Score, mit einer Remission definiert bei einem DAI ≤ 5 [95], charakterisiert.

2.5. Untersuchung potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression

Es wurde eine systematische Analyse potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression in Stuhl und Blut durchgeführt. Für die Analyse der Stuhlmengenuntersuchung sowie der Stuhl-Blut-Proportionstestung wurden fünf gesunde Probanden rekrutiert. Sie setzen sich aus zwei weiblichen und drei männlichen Probanden mit einem Altersmittelwert von 26,2 (23-33 Jahre) zusammen. Die Temperaturstabilitätsmessung wurde an Stuhlproben von zwei gesunden Studienteilnehmern und drei gastroenterologischen Patienten vorgenommen. Diese fünf Probanden setzen sich aus zwei weiblichen und drei männlichen Probanden mit einem Altersdurchschnitt von 55 (39-75 Jahre) zusammen.

2.5.1. Stuhlmengenuntersuchung

Für die Analyse verschiedener Stuhlmengen wurden von jedem Probanden jeweils Stuhlproben mit 25 μ l, 50 μ l und 100 μ l Menge asserviert und bei -30°C gelagert.

2.5.2. Stuhl-Blut-Proportionstestung

Die Proben von Stuhl, Serum und EDTA-Blut bestanden aus insgesamt jeweils 100 μ l Menge und wurden in folgenden Mischungsverhältnissen miteinander verglichen: 100% Stuhl, 90% Stuhl/10% Blut, 50% Stuhl/50% Blut und 100% Blut. Des Weiteren wurden Proben mit 100% Stuhl, 50% Stuhl/50% Serum und 100% Serum untereinander verglichen. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur miRNA-Isolation bei -30°C.

2.5.3. Temperaturstabilitätstest

Die Stuhlproben jedes Probanden wurden so aufgeteilt, dass jeweils 100µl Stuhl bei folgenden fünf Temperaturstufen gelagert wurden: -80°C, -80°C und nach 24 Stunden -30°C, -30°C, 4°C und 20°C. Die Lagerung erfolgte für insgesamt 14 Tage in den verschiedenen Temperaturen.

2.6. Methoden

Für die miRNA-Expressionsanalyse wurde zunächst die gesamte RNA aus den Proben isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben, um eine qRT-PCR durchführen zu können. Nachfolgend ist die Vorgehensweise detailliert beschrieben.

2.6.1. Probenasservierung

Nach Eintreffen im Labor wurden die Proben asserviert und anschließend bei -30°, mit Ausnahme der Temperatur-Stabilitätstestung, im Gefrierschrank gelagert. Die miRNA-Isolation erfolgte, mit Ausnahme der Stuhlmengentestung, aus jeweils 100µl Probe. Die Aufbereitung der Stuhlproben vor der Lagerung wurde wie folgt durchgeführt: Es wurde eine Messerspitze der Stuhlprobe mit 100µl destilliertem Wasser vermengt und in ein Eppendorfggefäß gefüllt. Bei sehr flüssigem Stuhl portionierten wir ebenfalls 100µl ohne Wasserzugabe zum flüssigen Stuhl. Sehr fester Stuhl wurde nach Zugabe von 100µl destilliertem Wasser mit dem Tissue-Ruptor (QIAGEN) gemörsert und homogenisiert.

2.6.2. miRNA-Isolation

Die Durchführung der miRNA-Isolation aus Stuhl-, Serum- und EDTA-Blut-Proben erfolgte, bis auf unten beschriebene kleine Modifikationen, nach Standard-Protokollanleitung des Herstellers. Es wurde das *miRNeasy Mini Kit* von der Firma QIAGEN (Cat. No. 217004, Hilden) verwendet. Für das Durchmischen der Proben wurde ein Vortex-Mischer verwendet. Zu Beginn der Laborarbeit musste eine Zentrifuge (Hettich Zentrifuge EBA 12R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen) auf 4°C vorgekühlt werden. Zum Pipettieren wurden Eppendorf Pipetten und sterile RNase-freie Pipettenspitzen (SafeSeal Tips Professional, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) verwendet.

1. Zugabe von 700µl QIAzol Lysis Reagenz zur Stuhlprobe in den QIAshredder

homogenizer (QIAGEN) unter einem Laborabzug. Zwei Minuten Zentrifugation bei Raumtemperatur und 10.000g, anschließend fünf Minuten Inkubation, ebenfalls bei Raumtemperatur.

2. Hinzugabe von 5µl der Referenz-miRNA cel-miR-39 in der Konzentration 5nM zur Normalisierung (mit Ausnahme der CED-Patienten-Stuhlproben).
3. Ergänzung von 140µl Chloroform zum Präzipitieren der miRNA. Mischung der Probenröhrchen für 15 Sekunden auf dem Vortexgerät, danach Inkubation für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000g und 4°C. Danach Füllung der wässrigen Phase in ein neues Röhrchen.
4. Hinzufügen des 1,5fachen Volumens der wässrigen Phase von hundertprozentigem Ethanol und Mischung durch mehrmaliges Pipettieren. Füllen von bis zu 700µl von dieser Lösung auf die RNeasy Mini Spin Column in die 2mL Collection Tubes. Daraufhin Zentrifugation dieser Röhrchen (Collection Tubes mit RNeasy Mini Spin Column) für 15 Sekunden bei 10.000g und anschließende Entfernung des Durchflusses. Füllen, wie im vorangegangenen Schritt (falls mehr als 700µl vorhanden waren), der übrigen Lösung auf die RNeasy Mini Spin Column in die 2ml Collection Tubes. Anschließend Zentrifugation bei 10.000g für ebenfalls 15 Sekunden, danach Entfernung des Durchflusses.
5. Zum Spülen der Säule mit Puffer, Gabe von 700µl RWT-Puffer auf die Mini Spin Column und Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10.000g bei Raumtemperatur. Anschließend Entfernung des Durchflusses.
6. Der gleiche Schritt erfolgte nun mit 500µl RPE-Puffer. Es wurde wieder die Pufferlösung auf die Säule (Mini Spin Column) gegeben, für 15 Sekunden bei 10.000g und Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend der Durchfluss entfernt.
7. Ein erneutes Mal wurden nun 500µl RPE-Puffer auf die Mini Spin Column gegeben und diesmal zwei Minuten bei 10.000g zentrifugiert.
8. Einsetzen der MiniSpin Column in ein neues 2ml Collection Tube, daraufhin trockene Zentrifugation, ohne Zugabe eines weiteren Puffers, für eine Minute bei 12.000g.
9. Einsetzen der Mini Spin Column in ein 1,5ml Collection Tube. Zugabe von 50µl RNase-freiem Wasser auf die Säule. Nach einminütiger Zentrifugation bei 10.000g wurde das Eluat nochmals auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 10.000g zentrifugiert. Die

miRNA wurde nun durch Hinzufügen des Wassers aus der Säule gelöst und befand sich anschließend im Eluat, welches sofort auf Eis gelagert wurde.

10. Die Asservation der isolierten miRNA bei -80°C erfolgte in 1:30 Verdünnung mit $3\mu\text{l}$ Eluat und $87\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser.

2.6.3. Photometrische RNA-Messung

Zur Qualitätskontrolle der miRNA-Isolierung wurde im Anschluss an die Isolation eine photometrische RNA-Messung mit einem BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Messung wurden $3\mu\text{l}$ Eluat mit $67\mu\text{l}$ TE (Tris-EDTA) -Puffer gemischt und in eine Küvette gefüllt. Die Küvette wurde vorher markiert, um sicherzustellen, dass sie immer in gleicher Position in den Strahlengang gestellt wird. Als Leerwert wurden $70\mu\text{l}$ TE-Puffer verwendet. Das Photometer wurde auf eine RNA-Messung eingestellt und die Dilution mit $3\mu\text{l} + 67\mu\text{l}$ angegeben. Dann wurde zunächst mit der „Blank-Taste“ der Leerwert und gleich darauf auch zum Probedurchlauf ein „Sample“ und ein weiteres „Sample“ mit neuem TE-Puffer gemessen, wobei man einen Nullwert erwartete. Nun wurde die RNA-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ gemessen, wobei der Reinheitsgrad bei 260/280nm, die Ratio der reinen Nukleinsäure bei 260/230nm und die optische Dichte bei 260nm angegeben wurden.

2.6.4. Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription in cDNA wurden für miR-16, miR-155, miR-223 und für cel-miR-39 das TaqMan-Protokoll (TaqMan miRNA Assay, Applied Biosystems, CA, USA) und für miRNA-21 das SYBR Green-Protokoll (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien) verwendet. Zur Herstellung des Mastermixes für die Reverse Transkriptase-Reaktion wurden die benötigten Komponenten auf Eis aufgetaut und kurz per Vortex-Gerät durchmischt, damit kein Bodenabsatz bestehen blieb. Die einzelnen Mengen der Komponenten wurden anhand der Anzahl der geplanten Reaktionen errechnet und aufgrund von Pipettierverlusten mit einem Sicherheitszuschlag von 10% angepasst.

Für den TaqMan-Mastermix wurden folgende Reagenzien benötigt: $0,15\mu\text{l}$ 100 M dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate, molekulare Bausteine der DNA), $1\mu\text{l}$ Reverse Transkriptase, $1,5\mu\text{l}$ 10x RT-Puffer, $0,19\mu\text{l}$ RNase Inhibitor, $5\mu\text{l}$ Probe, $5,66\mu\text{l}$ RNase-freies Wasser und $1,5\mu\text{l}$ des 5fach konzentrierten Primers. Die Probe wurde jedoch erst ganz zum Schluss hinzugefügt.

Der Mastermix ergab somit, inklusive Probe und Primer, eine Menge von insgesamt 15µl Lösung. Diese wurde anschließend schonend geschüttelt und zentrifugiert. Die Anfertigung des Mastermixes erfolgte in einem Polypropylen Röhrchen. Der Mastermix verblieb bis zur weiteren Verwendung auf Eis. Im nächsten Arbeitsschritt wurden jeweils 10µl des Mastermixes inklusive Primer in die einzelnen Röhrchen der Reaktionsplatte (0,2ml 8er Softstrips, Biozym, Hessisch Oldendorf) pipettiert. Anschließend wurde die jeweilige Probe in die Röhrchen pipettiert, die Reaktionsreihen mit einem Deckel verschlossen, zentrifugiert und in den T3 Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen) gesetzt. Das Programm bestand aus folgenden Stufen: 30 Minuten auf 16°C, 45 Minuten auf 42°C, 5 Minuten auf 85°C und endete bei 4°C. Der Thermocycler blieb nach dem Umschreiben auf 4°C gekühlt, bis die Reaktionsplatte entnommen wurde.

Der Universal-Mastermix für SYBR Green entspricht in der Zusammensetzung dem des TaqMan-Mastermixes, mit Ausnahme der Menge an Wasser (5,91µl) und der Menge des Primers (1,25µl). Insgesamt ergibt sich jedoch ebenfalls eine Mastermix-Menge von 15µl. Der SYBR-Primer ist 3 picomolar (Zusammensetzung: 194µl H₂O+ 6µl (Primer 100pmol/µl)) und das Thermocycler-Programm durchläuft die gleichen Stufen, wie zuvor für das TaqMan-Protokoll beschrieben.

2.6.5. Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion

Zur Vervielfältigung der cDNA wurden quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktionen mit dem CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, CA, USA) durchgeführt und die Daten mit dem Bio-Rad CFX Manager Programm erfasst. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen der Proben angefertigt und Mikrotiterplatten mit 96 Nöpfchen (Multiplate PCR Plates 96-well, clear, thinwall polypropylen, Bio-Rad, CA, USA) verwendet. Vom hierbei generierten Ct (Threshold cycle) -Wert wurde jeweils der Mittelwert der doppelbestimmten Proben für die Auswertung verwendet. Der Ct-Wert ist ein Schwellenwert, welcher nach einer bestimmten Anzahl von PCR-Zyklen erreicht und durch ein Fluoreszenzsignal definiert wird. Je niedriger die Anzahl der durchlaufenen Zyklen, desto eher wird der Schwellenwert erreicht und desto mehr miRNA ist in der Probe enthalten. Aufgrund der Interplatten-Variabilität erfolgte ein Plattenabgleich mithilfe von Kontrollproben, sodass eine Vergleichbarkeit der Proben unabhängig vom Lauf gegeben war. Das bedeutet, dass der Schwellenwert angeglichen wurde, um die Ct-Werte vergleichen zu können. Zur relativen Quantifizierung wurden die Proben auf die Referenz-

miRNA cel-miR-39 normalisiert, um mögliche Abweichungen in der initialen Startmaterialmenge auszugleichen. Dafür wurden 5µl cel-miR-39 in 5-nanomolarer Konzentration vor der miRNA-Isolation zur Probe hinzugefügt. Die Normalisierung der CED-Serumproben sowie in der Analyse potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression auf die Referenz-miRNA cel-miR-39 wurde mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode durchgeführt. Dazu wurde für jede Probe die Differenz aus cel-miR-39 und der betreffenden miRNA berechnet und das Ergebnis in den Exponenten der Basis 2 gesetzt. Lediglich für die CED-Stuhlproben war anfangs eine Normalisierung auf miR-16 vorgesehen, welche sich allerdings in der Analyse als nicht sinnvoll erwies, da sich starke Expressionsschwankungen zeigten und ein geeignetes Referenzgen einer konstanten Expression unterliegen sollte [96]. Von den CED-Stuhlproben erfolgte daher eine Auswertung der Rohwerte.

Für die Durchführung anhand des TaqMan-Protokolls wurden zunächst folgende Reagenzien auf Eis bereitgestellt: 10µl TaqMan-Mastermix, 0,75µl Primer (20fach konzentriert), 4,25µl H₂O und 5µl Probe, welche ein Gesamtvolumen von 20µl ergeben. Die genannten Mengenangaben beziehen sich auf eine Reaktion und mussten je nach gewünschter Anzahl von Reaktionen multipliziert werden. Das PCR-Programm durchläuft für unterschiedlich lange Zeit die verschiedenen Temperaturstufen, um eine DNA-Vervielfältigung zu ermöglichen. Zunächst werden die Proben für zwei Minuten auf 50°C erwärmt und anschließend weiter auf 95°C erhitzt, wobei sie für zehn Minuten auf dieser Temperatur verbleiben, um eine Enzymaktivierung zu erreichen. In weiteren 15 Sekunden auf 95°C kommt es zur Denaturierung, d.h. die Doppelstränge werden in Einzelstränge geschmolzen. Im nächsten Schritt, bei 60°C für 60 Sekunden, können komplementäre Stränge hybridisieren und es folgt die Elongation. Die Schritte der Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation werden als Zyklus insgesamt 45-mal durchlaufen.

Für eine Reaktion gemäß SYBR Green-Protokoll ist die Verwendung folgender Komponenten erforderlich: 12,5µl Universal Mastermix, 1µl 10 pikomolarer Primer (10µl Forward+ 10µl Universal+ 190µl H₂O), 6,5µl H₂O und 5µl Probe. Dies ergibt ein Gesamtvolumen von 25µl. Das PCR-Programm für SYBR entspricht weitestgehend dem des TaqMan Programms, nur dass am Ende zusätzlich eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt wird (bei der Temperaturstufe 60°C wird alle fünf Sekunden um 0,5°C hochgeheizt bis 95°C erreicht sind).

2.6.6. Analyse von CRP-Wert und fäkalem Calprotectin (FC)

Der CRP-Wert (mg/l) wurde, ebenso wie der Hämoglobin- (mmol/l) und Hämatokrit-Wert (l/l), im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie als Teil von Routinebestimmungen gemessen. Die Analyse von FC wurde mittels Stuhlproben (~5g), welche von jedem Patienten gesammelt wurden, bestimmt. Etwa 100mg Stuhl wurden von jedem Patienten für die FC-Analyse verwendet. Für die Untersuchung von FC wurde das quantitative Calprotectin ELISA Kit (PhilCal® Calprotectin ELISA MRP8/14 S100A8/9, Immundiagnostik, Bensheim) anhand des Hersteller-Protokolls angewendet. Die Ergebnisse sind dargestellt als µg Calprotectin pro g Stuhl.

2.7. Statistische Analyse

Alle Werte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen. Die Daten wurden anschließend mit GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, USA) ausgewertet. Die Analyse ergab keine Normalverteilung der Daten. Aus diesem Grund erfolgte die weitere Auswertung mit nicht-parametrischen Tests. Unabhängige Stichproben wurden bei zwei zu vergleichenden Merkmalen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests und bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen anhand des Kruskal-Wallis-Tests ausgewertet. Für gepaarte Stichproben wurde bei mehr als zwei zu vergleichenden Stichproben der Friedman-Test angewandt. Als Post-hoc-Test wurde der Dunn's Test zur Überprüfung, ob signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen vorliegen, angewendet. Eine Signifikanz (*) wurde bei p-Werten kleiner als 0,05 angenommen. Die statistische Auswertung umfasste weiterhin die Bestimmung des Medians, der Spannweite, der 25. und 75. Perzentile, des Mittelwerts, der 95% Konfidenzintervalle, der Standardabweichung und des Standardfehlers für die jeweilige untersuchte miRNA und Kohorte. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in „Boxplots“ mit Maximal- und Minimalwert, 25. und 75. Perzentile sowie der 50. Perzentile (Median). Im Ergebnisteil wurde gelegentlich beispielhaft der Median mit Minimal- und Maximalwert angegeben.

Für die quantitative Beurteilung der Genexpression (x-fache Änderung) wurde für Serumproben die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode und für Stuhlproben die $2^{-\Delta Ct}$ -Methode verwendet. Aufgrund der nicht-parametrischen Daten erfolgte die Berechnung anhand des Medians [97]. Für Serumproben wurde jeweils für die Patientenproben und die Kontrollen eine Differenz aus dem Ct-Wert der miRNA und der Referenz-miRNA bestimmt. Die Differenz dieser beiden Ergebnisse wurde dann

mit negativem Vorzeichen in den Exponenten mit der Basis 2 gesetzt ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Anl. 1). Das Ergebnis davon entspricht der Expressionsänderung [97]. Bei den nicht normalisierten Stuhlproben wurde die Differenz aus dem Ct-Wert der betreffenden miRNA und der Kontrolle berechnet und anschließend wurde das Ergebnis mit negativem Vorzeichen in den Exponenten der Basis 2 gesetzt ($2^{-\Delta C_t}$) (Anl. 1).

Zur Testung einer Abhängigkeit zwischen zwei verbundenen Stichproben wurde die nicht-parametrische Spearman Korrelationsanalyse angewandt und die Regressionsgerade mit Berechnung graphisch dargestellt. Es wurde die jeweilige miRNA-Expression in Stuhl und Serum korreliert. Des Weiteren untersuchten wir eine Korrelation des FC-, CRP-, Hämoglobin- und des Hämatokrit-Wertes mit der Expression der vier untersuchten miRNAs im Serum und im Stuhl. Nicht-signifikante Korrelationen wurden im Ergebnisteil nicht aufgeführt.

2.8. Eigenanteil

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden folgende Arbeitsschritte in Eigenleistung durchgeführt:

- Akquirierung der prospektiv gesammelten Proben
- Extraktion der RNA aus Stuhl-, Serum- und EDTA-Proben (in Kooperation mit Nha Le)
- Bestimmung der miR-16, miR-21, miR-155 und miR-223 mittels RT und qRT-PCR (in Kooperation mit Nha Le)
- Statistische Auswertung der Ergebnisse unter Betreuung durch PD Dr. med. habil. Alexander Link

3. Ergebnisse

Die Auswertung der Promotionsarbeit umfasst einerseits die Untersuchung der miRNA-Expression in Serum- und Stuhlproben von Patienten mit CED und andererseits die systematische Analyse potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression im Stuhl.

3.1. miRNAs im Serum bei CED-Patienten

Aus früheren Studien ist bekannt, dass CD und UC mit miRNA-Veränderungen im Serum assoziiert sind. Um diese Ergebnisse zu validieren, untersuchten wir zunächst die Veränderungen im Serum von CED-Patienten. Für diesen Zweck wurden die miRNAs miR-16, miR-21, miR-155 und miR-223 auf Expressionsveränderungen in CED untersucht.

3.1.1. miRNA-Expression in CED-Serumproben

Als erstes wurden die miRNA-Expressionen von allen CED-Serumproben (CD und UC) mit Kontrollproben verglichen (Abb. 3 und Anl. 1). CED-Patienten zeigten im Serum deutlich höhere miR-16-Expressionen (2,9fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median (min; max) $5,8 \cdot 10^{-3}$ ($1,9 \cdot 10^{-4}$; $9,1 \cdot 10^{-2}$) vs. $2 \cdot 10^{-3}$ ($1,5 \cdot 10^{-4}$; $1,1 \cdot 10^{-2}$), $p=0,0105$ entsprechend) (Abb. 3A). Ähnlich konnten wir die miR-21-Expression im Serum mit 2,7fach höheren Expressionen als in den Kontrollen nachweisen ($2,1 \cdot 10^{-4}$ ($2,2 \cdot 10^{-5}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$) vs. $6,4 \cdot 10^{-5}$ ($1,3 \cdot 10^{-5}$; $3,4 \cdot 10^{-4}$) (Abb. 3B). Noch höher war der miR-223-Expressionsunterschied mit 3,8fach höheren Expressionen in CED im Vergleich zu den Kontrollen ($1,8 \cdot 10^{-2}$ ($2,9 \cdot 10^{-3}$; $1,4 \cdot 10^{-1}$) vs. $6,1 \cdot 10^{-3}$ ($2,7 \cdot 10^{-4}$; $2,6 \cdot 10^{-2}$)) (Abb. 3D). Dagegen fanden wir keinen signifikanten Expressionsunterschied für miR-155 (Abb. 3C).

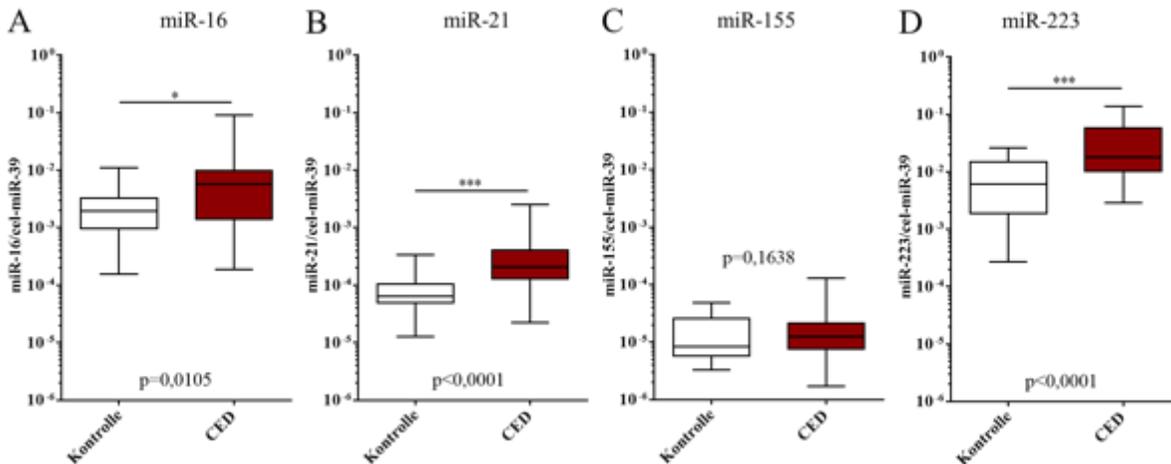


Abb. 3: miRNA-Expression in CED-Serumproben im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=20, CED (rot) n=51. Die Werte sind dargestellt als relative miRNA-Expression (A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223), jeweils normalisiert auf cel-miR-39 mithilfe der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Mann-Whitney-U-Test und die Signifikanz (*) als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

3.1.2. miRNA-Expression in CD- und UC-Serumproben

CD und UC gehören zwar beide zu den CED, unterscheiden sich jedoch voneinander. Um in der Entität spezifische Unterschiede feststellen zu können, wurden die CED-Serumproben daher für die detaillierte Subgruppenanalyse entsprechend vorliegender Grundkrankheit in CD- und UC-Serumproben aufgeteilt und mit der Kontrollgruppe sowie untereinander verglichen (Abb. 4 und Anl. 1).

Drei untersuchte miRNAs (miR-16, miR-21 und miR-223) wiesen jeweils signifikante Expressionsunterschiede auf. Dabei war für alle drei miRNAs die Expression in CD- im Vergleich zu UC- und Kontrollkohorten am höchsten. Wir fanden keine signifikanten Veränderungen zwischen den Kontrollen und der UC-Gruppe.

CD-Serumproben von miR-16 ($7,8 \cdot 10^{-3}$ ($1,9 \cdot 10^{-4}$; $9,1 \cdot 10^{-2}$)) hatten beispielsweise eine ca. 4,5fach höhere Expression als Kontroll-Serumproben ($2 \cdot 10^{-3}$ ($1,5 \cdot 10^{-4}$; $1,1 \cdot 10^{-2}$)) und eine sogar etwa 5,7fach höhere Expression als UC-Serumproben ($9,7 \cdot 10^{-4}$ ($5,6 \cdot 10^{-4}$; $5,3 \cdot 10^{-3}$)) (Abb. 4A). Ähnliche Veränderungen wurden bei der Analyse der miR-21 festgestellt (Abb. 4B).

Die stärksten Veränderungen wurden für miR-223 beobachtet (Kruskal-Wallis-Test, p<0,0001). Hier ergab sich eine etwa 5,8fach höhere Expression der CD-Serumproben verglichen mit den Kontrollproben ($3,6 \cdot 10^{-2}$ ($4,1 \cdot 10^{-3}$; $1,4 \cdot 10^{-1}$) vs. $6,1 \cdot 10^{-3}$ ($2,7 \cdot 10^{-4}$; $2,6 \cdot 10^{-2}$), p<0,001 in Dunn's Post-hoc-Test) und eine etwa 3,8fach höhere Expression der CD- verglichen mit den UC-

Serumproben ($3,6 \cdot 10^{-2}$ ($4,1 \cdot 10^{-3}$; $1,4 \cdot 10^{-1}$) vs. $1,1 \cdot 10^{-2}$ ($2,9 \cdot 10^{-3}$; $4,8 \cdot 10^{-2}$), $p < 0,001$ in Dunn's Post-hoc-Test) (Abb. 4D). Wie auch in den CED-Serumanalysen konnten wir für die miR-155 insgesamt keine signifikanten Expressionsunterschiede nachweisen (Abb. 4C).

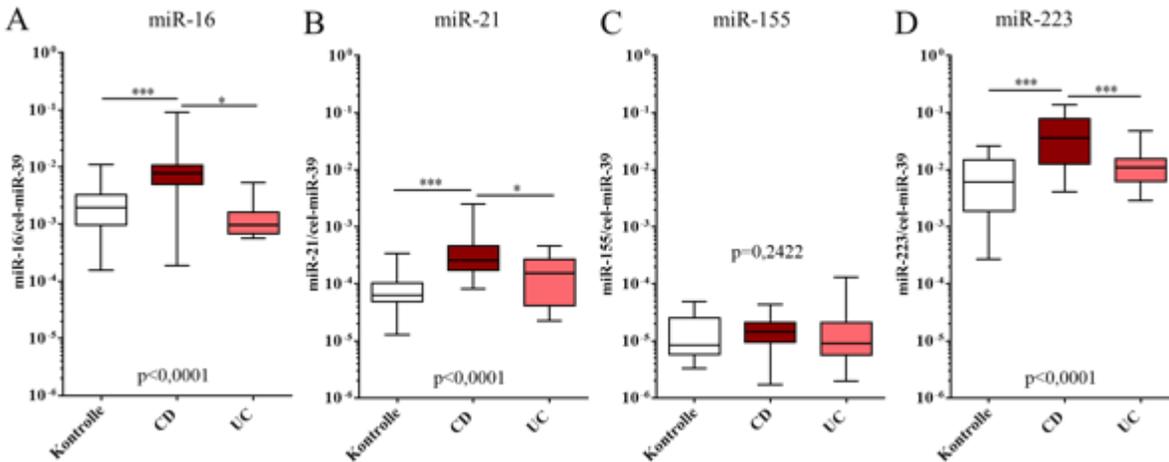


Abb. 4: miRNA-Expression in CD- und UC-Serumproben sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=20, CD (rot) n=36, UC (rosa) n=15. Die Werte sind dargestellt als relative miRNA-Expression (A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223), jeweils normalisiert auf cel-miR-39 mithilfe der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.1.3. miRNA-Expression in Serumproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CED-Patienten in Remission

Im nächsten Schritt untersuchten wir, ob Serum-miRNA-Veränderungen mit der Erkrankungsaktivität korrelieren. Dafür wurden die Proben von CED-Patienten in Proben von Patienten mit akutem Schub der Erkrankung und Proben von Patienten in Remission eingeteilt (Abb. 5).

Patienten im akuten Schub einer CED hatten deutlich höhere miR-16-Werte (ca. 3,1fach), verglichen mit der Kontrollgruppe, nicht jedoch im Vergleich mit Patienten in Remission. Bei miR-21 und miR-223 bestand jeweils ein signifikanter Expressionsunterschied sowohl zwischen den CED-Patienten im aktiven Erkrankungsstadium und den Kontrollen als auch zwischen den Patienten in Remission und der Kontrollgruppe. Die miR-21-Serumproben von CED-Patienten im akuten Schub wiesen im Vergleich zu Kontrollen eine 3,1fach höhere Expression auf ($2,3 \cdot 10^{-4}$ ($2,2 \cdot 10^{-5}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$) vs. $6,4 \cdot 10^{-5}$ ($1,3 \cdot 10^{-5}$; $3,4 \cdot 10^{-4}$)). Auch die miR-21 Proben von Patienten in Remission wiesen eine 3fach höhere Expression als in den Kontrollen auf ($2,1 \cdot 10^{-4}$ ($8,2 \cdot 10^{-5}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$) vs. $6,4 \cdot 10^{-5}$ ($1,3 \cdot 10^{-5}$; $3,4 \cdot 10^{-4}$)) (Abb. 5B). Die Expression der miR-223 in Proben von

Patienten mit aktiver Erkrankung war 5,4fach höher als in Kontrollen ($3,6 \cdot 10^{-2}$ ($2,9 \cdot 10^{-3}$; $1,4 \cdot 10^{-1}$) vs. $6,1 \cdot 10^{-3}$ ($2,7 \cdot 10^{-4}$; $2,6 \cdot 10^{-2}$) und die Expression von Remissionsproben 1,9fach höher als in Kontrollen ($1,4 \cdot 10^{-2}$ ($4,1 \cdot 10^{-3}$; $1 \cdot 10^{-1}$) vs. $6,1 \cdot 10^{-3}$ ($2,7 \cdot 10^{-4}$; $2,6 \cdot 10^{-2}$)) (Abb. 5D). Für die miR-155 lagen auch zwischen den hier untersuchten Gruppen keine signifikanten Expressionsunterschiede vor (Abb. 5C). Obwohl die Proben der CED-Patienten in Remission bei allen vier untersuchten miRNAs niedrigere Werte als im aktiven Stadium zeigten, konnten wir keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur CED mit Aktivität feststellen.

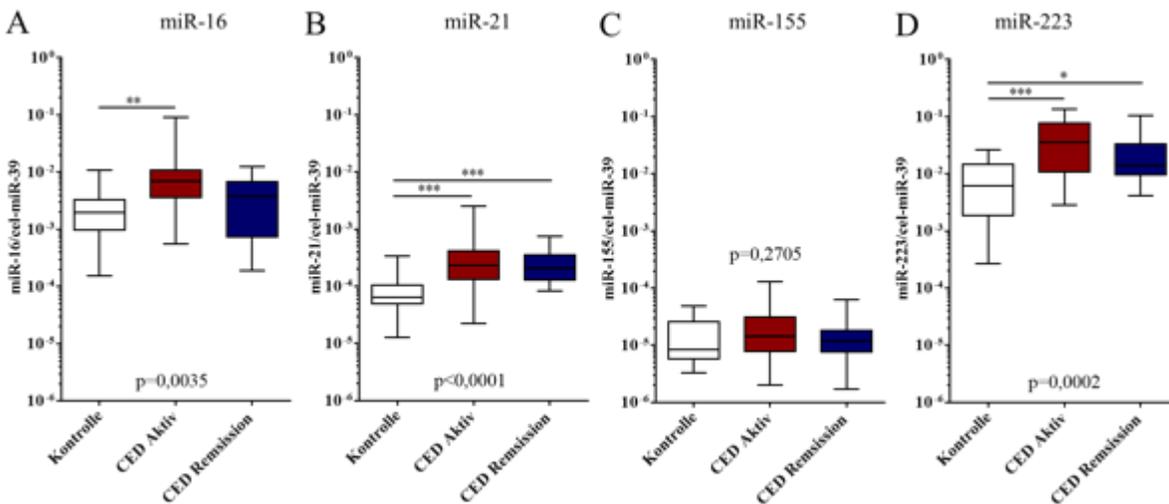


Abb. 5: miRNA-Expression in Serumproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CED-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=20, Aktiv (rot) n=28, Remission (blau) n=23. Die Werte sind dargestellt als relative miRNA-Expression (A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223), jeweils normalisiert auf cel-miR-39 mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

3.1.4. miRNA-Expression in Serumproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CD-Patienten in Remission

Im letzten Schritt der Subgruppen-Analysen der Serumproben evaluierten wir die miRNA-Veränderungen für jede Entität im Hinblick auf die Aktivität separat.

In Abb. 6 und Anl. 1 sind quantitative miRNA-Expressionsunterschiede zwischen Proben von CD-Patienten mit akutem Erkrankungsschub, CD-Patienten in Remission und Kontrollproben dargestellt. Die miR-16-Expression der CD-Serumproben lag bei aktiv Erkrankten ca. 5,6fach höher als bei Kontrollprobanden ($10 \cdot 10^{-3}$ ($4,9 \cdot 10^{-3}$; $9,1 \cdot 10^{-2}$) vs. $2 \cdot 10^{-3}$ ($1,5 \cdot 10^{-4}$; $1,1 \cdot 10^{-2}$)) und etwa 1,6fach höher als bei Patienten in Remission ($10 \cdot 10^{-3}$ ($4,9 \cdot 10^{-3}$; $9,1 \cdot 10^{-2}$) vs. $6,2 \cdot 10^{-3}$

($1,9 \cdot 10^{-4}$; $1,3 \cdot 10^{-2}$) (Abb. 6A).

Bei der Auswertung der miR-21-Expression fielen deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollproben und den Proben aktiv Erkrankter (ca. 4,5fach) ($6,4 \cdot 10^{-5}$ ($1,3 \cdot 10^{-5}$; $3,4 \cdot 10^{-4}$) vs. $3,6 \cdot 10^{-4}$ ($1,2 \cdot 10^{-4}$; $2,5 \cdot 10^{-3}$); $p < 0,001$ in Dunn's Post-hoc-Test) sowie zwischen den Kontrollproben und den Proben von Patienten in Remission (ca. 2,9fach) ($6,4 \cdot 10^{-5}$ ($1,3 \cdot 10^{-5}$; $3,4 \cdot 10^{-4}$) vs. $1,9 \cdot 10^{-4}$ ($8,2 \cdot 10^{-5}$; $7,5 \cdot 10^{-4}$); $p < 0,001$ in Dunn's Post-hoc-Test) auf (Abb. 6B).

Interessanterweise ergab die Analyse der miR-155 in der CD-Kohorte erstmals höhere Werte bei Patienten mit aktiver Erkrankung (ca. 1,9fach) als in Kontrollproben und ca. 2,1fach höhere Werte als bei Patienten in Remission (Abb. 6C). Die größten Veränderungen bestanden für miR-223 mit einer ca. 8,5fach höheren Expression bei aktiv Erkrankten als bei Kontrollen. Zwischen CD mit aktiver Erkrankung und CD in Remission fanden wir nur die Veränderung für miR-16 und miR-155, nicht jedoch für miR-21 und miR-223.

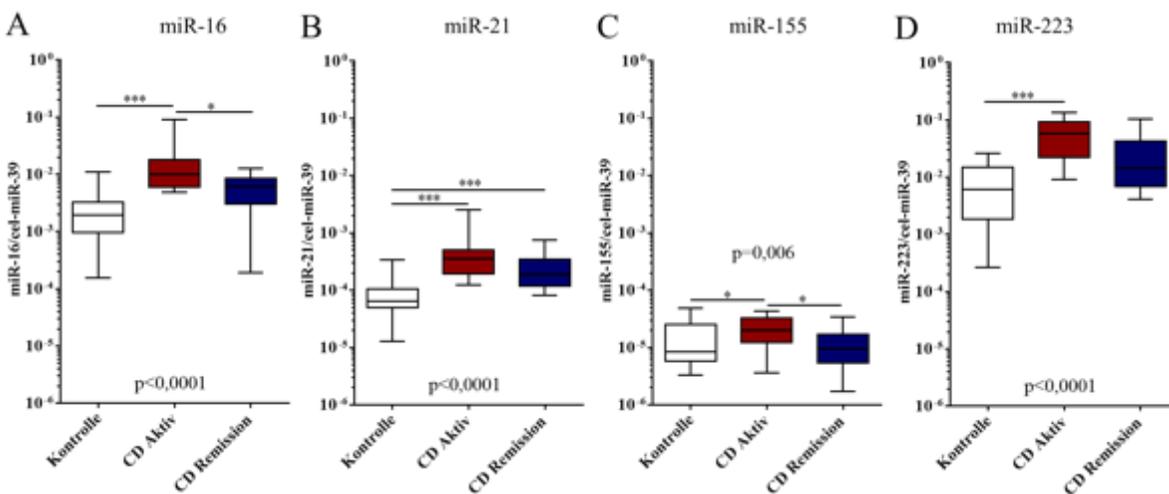


Abb. 6: miRNA-Expression in Serumproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CD-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=20, CD Aktiv (rot) n=20, CD Remission (blau) n=16. Die Werte sind dargestellt als relative miRNA-Expression (A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223), jeweils normalisiert auf cel-miR-39 mithilfe der $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.1.5. miRNA-Expression in Serumproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung und von UC-Patienten in Remission

Analog zur Untersuchung der quantitativen miRNA-Expression bei Serumproben von CD-Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität wurde dies auch bei UC-Patienten analysiert (Abb. 7). Im Vergleich zur CD-Kohorte bestand ein sehr heterogenes Bild für die miRNA-

Expression. Trotzdem gab es einige signifikante Veränderungen, wie z.B. höhere miR-21 und miR-223-Expressionen in UC-Patienten in Remission im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch wenn miR-155 minimale Veränderungen zwischen UC-Patienten in Remission und aktiver Erkrankung zeigte, waren diese Veränderungen nicht signifikant zur Kontrollgruppe und somit wahrscheinlich von geringer Relevanz. Keine Veränderungen konnten in der Expression der miR-16 festgestellt werden (Abb. 7A).

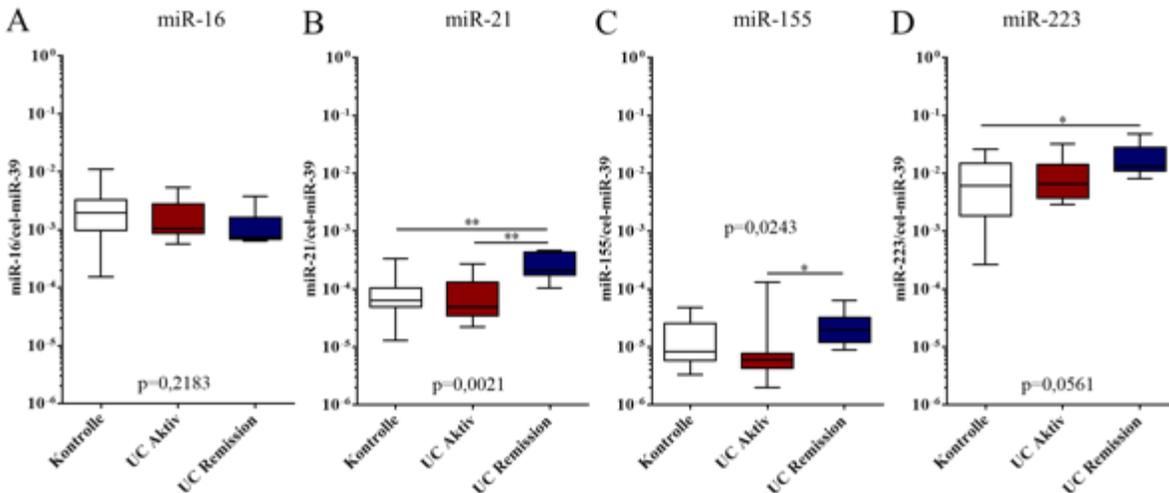


Abb. 7: miRNA-Expression in Serumproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung und von UC-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=20, UC Aktiv (rot) n=8, UC Remission (blau) n=7. Die Werte sind dargestellt als relative miRNA-Expression (A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223), jeweils normalisiert auf cel-miR-39 mithilfe der $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die CD-Patienten deutlich höhere miRNA-Expressionsveränderungen im Serum als UC-Patienten aufwiesen. Diese korrelierten mit der Krankheitsaktivität.

3.2. miRNAs im Stuhl bei CED-Patienten

In vorangegangenen Untersuchungen fand man heraus, dass das KRK mit miRNA-Veränderungen im Stuhl assoziiert ist [89,91–93]. Basierend auf den Erkenntnissen, dass die Mukosa von CED-Patienten veränderte miRNA-Expressionen aufweist [81–83], untersuchten wir den Stuhl von CED-Patienten.

3.2.1. miRNA-Expression in CED-Stuhlproben

In ähnlicher Art wie bei den Serumproben wurden die Untersuchungen zunächst in der gesamten CED-Kohorte, anschließend in Subgruppen (CD und UC) und schließlich in Subgruppen nach Aktivität (akuter Schub vs. Remission) untersucht.

Frühere Studien zeigen, dass miR-16 zur Normalisierung von Stuhlproben verwendet werden kann. Unsere erste Analyse der Proben ergab, dass die miR-16-Expression eine deutliche Variabilität in CED aufweist, welche in der Kontrollgruppe nicht vorlag. Dies führte zu der Vermutung, dass CED mit miR-16-Veränderungen im Stuhl assoziiert sein könnten. Da bislang keine anerkannte Normalisierung für Stuhl existiert, erfolgten die weiteren Messungen basierend auf dem Stuhlvolumen bzw. der Extraktionsmenge und den Rohwerten (niedrigere Werte bedeuten eine höhere Konzentration und umgekehrt; dabei bedeutet ein Ct-Wert einen 2fachen Unterschied). Die Veränderungen der miR-16, miR-21, miR-155 und miR-223-Expression in CED-Stuhlproben im Vergleich zur Kontrollgruppe sind in Abb. 8 und Anl. 1 dargestellt.

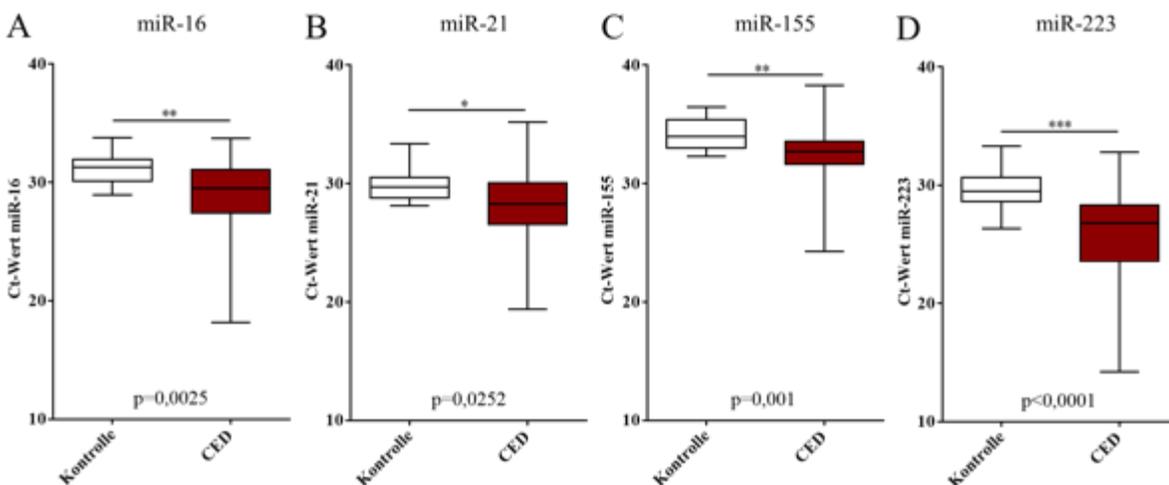


Abb. 8: miRNA-Expression in CED-Stuhlproben im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=15, CED (rot) n=57. A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Mann-Whitney-U-Test und die Signifikanz (*) als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

Für alle vier miRNAs konnten wir signifikant höhere Expressionen im Stuhl von CED-Patienten feststellen. Der deutlichste Unterschied lag für miR-223 mit einer etwa 6,5fach höheren Expression von CED-Stuhlproben im Vergleich zu Kontroll-Stuhlproben (Median (min; max) 26,8 (14,2; 32,8) vs. 29,5 (26,3; 33,3); entsprechend p<0,0001) vor (Abb. 8D).

3.2.2. miRNA-Expression in CD- und UC-Stuhlproben

Im weiteren Schritt untersuchten wir die Veränderungen für CD und UC im Vergleich zueinander (Abb. 9).

Für miR-16, miR-155 und miR-223 bestand jeweils ein deutlicher Expressionsunterschied zwischen der Kontroll- und CD-Kohorte sowie zwischen der Kontroll- und UC-Kohorte. Die Expression von miR-223 in den CD-Stuhlproben war beispielsweise etwa 5,7fach höher als in den Kontrollproben (27,1 (14,2; 32,8) vs. 29,5 (26,3; 33,3), $p < 0,001$ in Dunn's Post-hoc-Test) und in den UC-Stuhlproben bis ca. 10,2fach höher als in den Kontrollproben (26,2 (16,4; 30,5) vs. 29,5 (26,3; 33,3), $p < 0,01$ in Dunn's Post-hoc-Test) (Abb. 9D). Auch für miR-16 und miR-155 fanden wir einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen CD und Kontrollen sowie einen sehr signifikanten Unterschied in der Expression von UC und Kontrollen. Interessanterweise wurden bei relativ deutlichen Abweichungen der miR-21 keine signifikanten Veränderungen zwischen den Proben festgestellt.

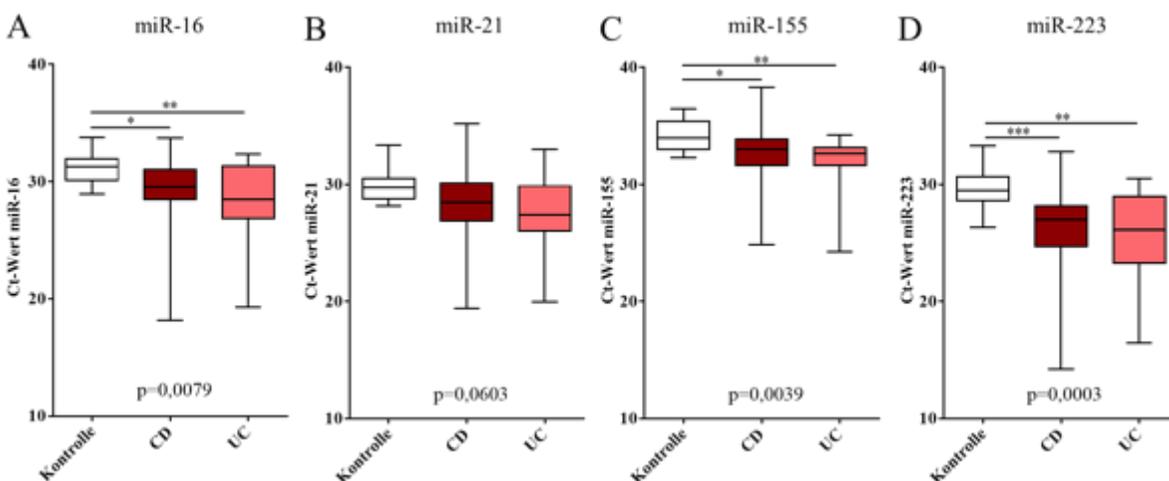


Abb. 9: miRNA-Expression in CD- und UC-Stuhlproben sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=15, CD (rot) n=39, UC (rosa) n=18. A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.2.3. miRNA-Expression in Stuhlproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CED-Patienten in Remission

Als nächstes teilten wir die Patienten entsprechend der Erkrankungsaktivität auf. Dabei wurden aktiv erkrankte Patienten von solchen, die sich in Remission befanden, unterschieden (Abb. 10). Alle vier untersuchten miRNAs zeigten einen deutlichen Expressionsunterschied zwischen den

Stuhlproben der Kontrollen und den Stuhlproben der CED-Patienten mit akutem Erkrankungsschub. Die CED-Proben von Patienten mit akutem Schub hatten eine etwa 5,5fach höhere miR-16-Expression als die Proben der Kontrollprobanden (28,8 (18,2; 33,7) vs. 31,3 (29; 33,8)) und eine ca. 3fach höhere Expression als Proben von Patienten in Remission (28,8 (18,2; 33,7) vs. 30,4 (28,1; 33,8)) (Abb. 10A und Anl. 1). Für miR-223 war die Expression der aktiven CED-Proben sogar ca. 17,1fach höher als bei den Kontrollproben (25,4 (14,2; 30,3) vs. 29,5 (26,3; 33,3)) und etwa 6,1fach höher als in Remissionsproben (25,4 (14,2; 30,3) vs. 28 (24,7; 32,8)) (Abb. 10D und Anl. 1). Es fiel auf, dass insgesamt kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Remissionskohorte vorlag.

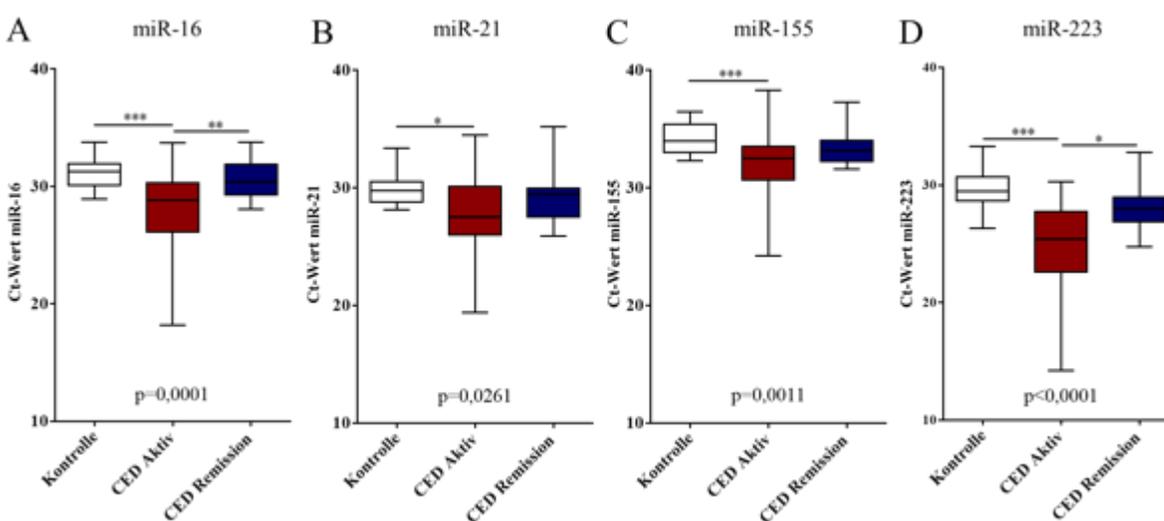


Abb. 10: miRNA-Expression in Stuhlproben von CED-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CED-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=15, Aktiv (rot) n=36, Remission (blau) n=21. A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

3.2.4. miRNA-Expression in Stuhlproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CD-Patienten in Remission

In diesem Abschnitt vergleichen wir CD- und UC-Patienten dezidiert entsprechend der Erkrankungsaktivität (Abb. 11). Die Expression der vier untersuchten miRNAs in Stuhlproben von aktiv erkrankten CD-Patienten war jeweils höher als in Proben von Patienten in Remission als auch in Kontrollproben (auch wenn nicht immer signifikante Unterschiede vorlagen). Der stärkste miRNA-Expressionsunterschied war für miR-223 mit einer etwa 13,1fach höheren Expression in den aktiven CD-Stuhlproben im Vergleich zu den Kontrollproben (26,4 (14,2; 30,3)

vs. 29,5 (26,3; 33,3), $p < 0,001$ im Dunn's Post-hoc-Test) zu verzeichnen (Abb. 11D). Für miR-21 ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen untersuchten Kohorten aufzeigen. Ausschließlich für miR-16 zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen aktiven und in Remission befindlichen Erkrankten. Wie bereits bei dem Vergleich der CED-Stuhlproben beschrieben, ließen sich zwischen Kontroll- und Remissions-Stuhlproben für die vier untersuchten miRNAs keine signifikanten Expressionsunterschiede darstellen.

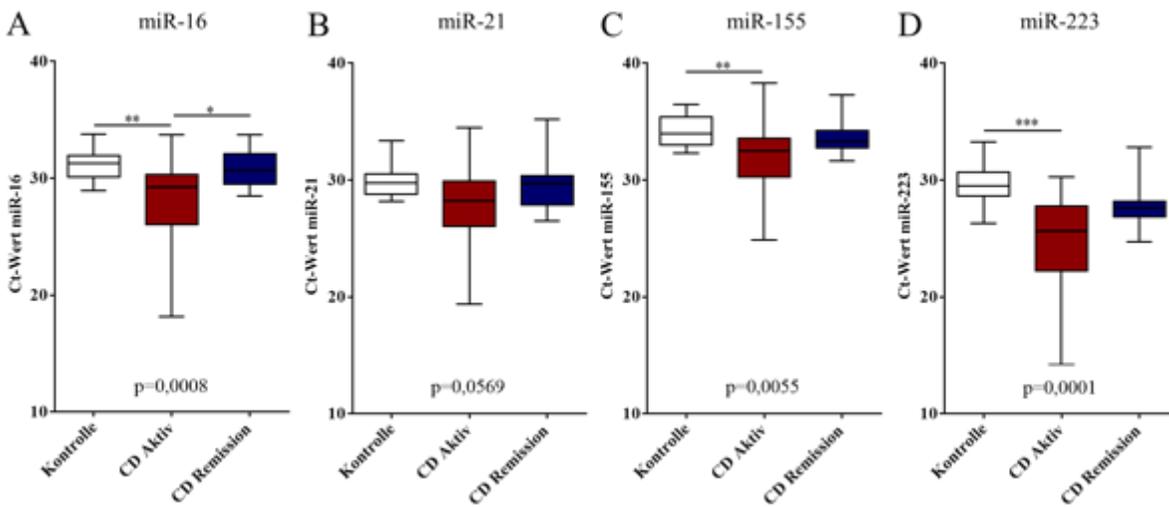


Abb. 11: miRNA-Expression in Stuhlproben von CD-Patienten mit aktiver Erkrankung und von CD-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) $n=15$, CD Aktiv (rot) $n=26$, CD Remission (blau) $n=13$. A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.2.5. miRNA-Expression in Stuhlproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung und von UC-Patienten in Remission

Analog zur Auswertung der CD-Stuhlproben von Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität im Vergleich zu Kontroll-Stuhlproben wurden auch die Stuhlproben von UC-Patienten hinsichtlich ihrer Erkrankungsaktivität analysiert (Abb. 12). Für miR-16, miR-155 und miR-223 wurde ein deutlicher Expressionsunterschied für den Vergleich von der Kontrollgruppe mit den Patienten im aktiven Erkrankungsschub festgestellt. MiR-223-Stuhlproben von UC-Patienten im akuten Erkrankungsschub zeigten sogar eine 67,7fach höhere Expression als Kontroll-Stuhlproben (23,4 (16,4; 29,1) vs. 29,5 (26,3; 33,3); entsprechend $p = 0,0005$ im Kruskal-Wallis-Test). Im Gegensatz zu den Untersuchungen in CED und CD bestand in UC ein signifikanter Unterschied für miR-155 zwischen der Kontrollgruppe und den Remissionsproben,

während keine Signifikanz zwischen Proben von UC-Patienten im akuten Schub und Proben von UC-Patienten in Remission erreicht wurde. Die miR-21 wies insgesamt trotz höherer Expression der aktiv Erkrankten keine signifikanten miRNA-Expressionsunterschiede auf.

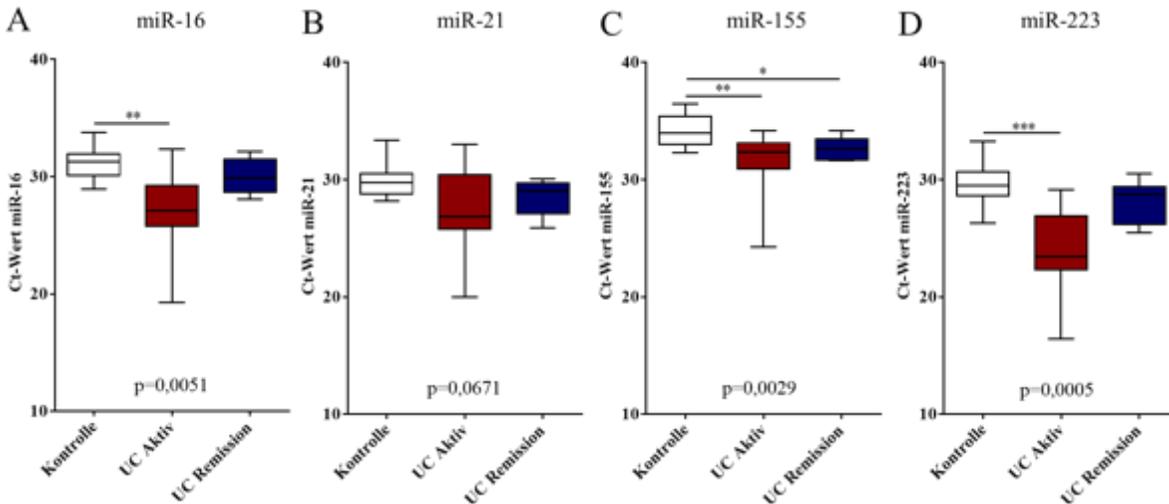


Abb. 12: miRNA-Expression in Stuhlproben von UC-Patienten mit aktiver Erkrankung und von UC-Patienten in Remission sowie in der Kontrollgruppe.

Kontrolle (weiß) n=15, UC Aktiv (rot) n=10, UC Remission (blau) n=8. A: miR-16, B: miR-21, C: miR-155, D: miR-223. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Kruskal-Wallis-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

Zusammenfassend konnten wir im Stuhl im Vergleich zu Serumproben deutliche Unterschiede in der miRNA-Expression sowohl für CD als auch für UC feststellen. Die Veränderungen korrelierten eindrucksvoll mit der Erkrankungsaktivität und zeigten eine zumindest partielle Normalisierung in Remission.

3.3. miRNA-Expression und Korrelation zu Entzündungsmarkern in CED

Nachdem wir die Veränderungen der miRNA-Expression im Serum und Stuhl identifiziert haben, wollten wir untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen den beiden Probenarten gibt (Abb. 13). Letztendlich wurde keine Korrelation zwischen fäkalen und zirkulierenden miRNAs festgestellt, was nahelegt, dass lokale Veränderungen an der Mukosa nicht unmittelbar den systemischen Zustand widerspiegeln.

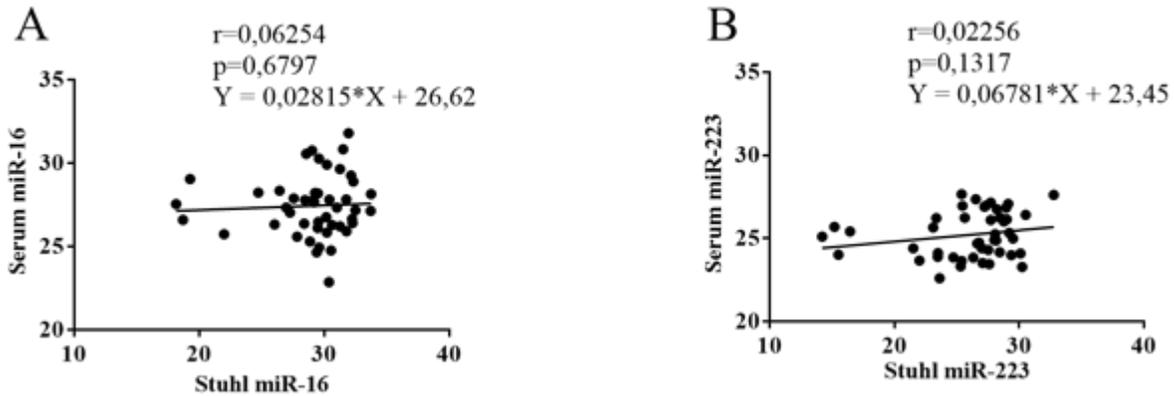


Abb. 13: Korrelation der miRNA-Expression in Stuhl und Serum.

A: Korrelation der miRNA-16-Expression in Stuhl und Serum, B: Korrelation der miRNA-223-Expression in Stuhl und Serum. $n=46$. Es wurden jeweils die Rohwerte verglichen. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Spearman-Korrelationsanalyse.

Bisher stellen CRP und FC häufig eingesetzte Surrogatmarker für die Einschätzung der Erkrankungsaktivität von CED-Patienten dar. Um zu überprüfen, inwieweit die miRNA-Expression mit laborchemischen Biomarkern assoziiert ist, wurden Parameter wie der CRP-Wert, der Hkt- und Hb-Wert als auch FC, mit miRNA-Expressionen im Stuhl und Serum korreliert.

Interessanterweise korrelierten nur fäkale, jedoch keine Serum-miRNAs, mit Parametern, wie CRP und FC, obwohl gemäß unserer Auswertung eine positive Assoziation mit der Entzündungsaktivität vorlag (relevanteste Daten in Abb. 14 dargestellt). Vor allem fäkale miR-16 ($p=0,0068$) und miR-223 ($p=0,0151$) korrelierten signifikant mit CRP-Werten in Stuhlproben von CED-Patienten. Weiterhin korrelierte fäkale miR-223 mit FC ($p=0,0363$) (Abb. 14). Die Korrelation von miRNAs mit Hkt- und Hb-Werten ergab keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt).

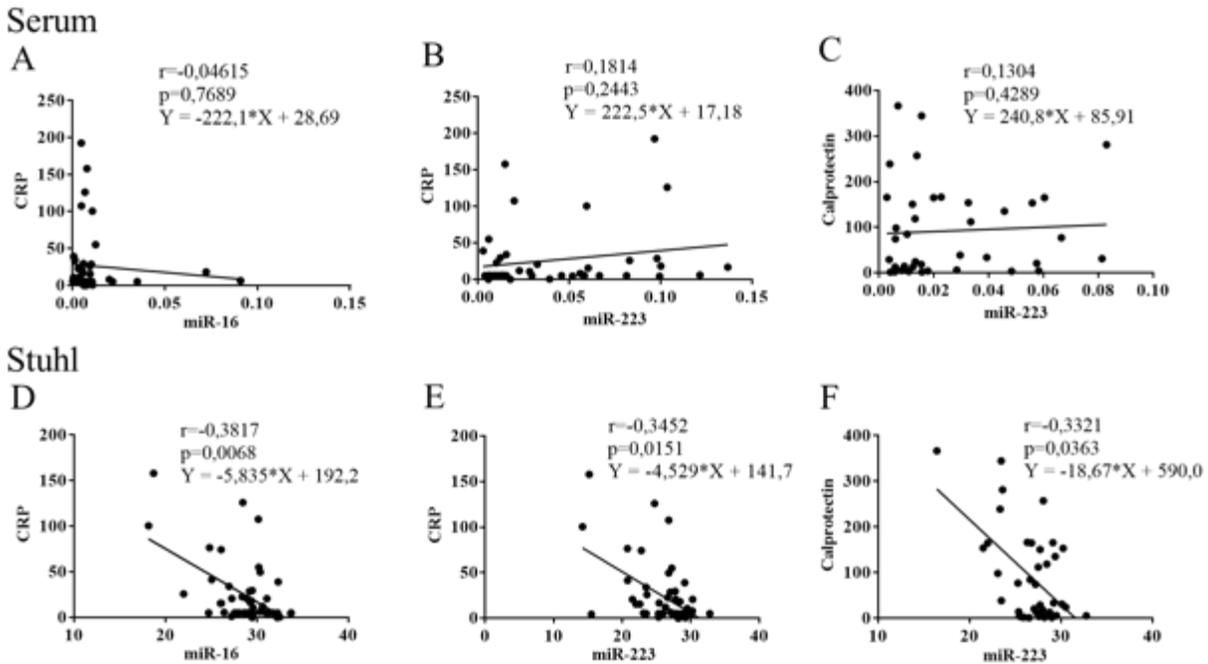


Abb. 14: Korrelation zwischen den entzündlichen Biomarkern und der miRNA-Expression in CED-Patienten.

A: Korrelation zwischen CRP-Werten und der miR-16-Expression im Serum. n=43. B: Korrelation zwischen CRP-Werten und der miR-223-Expression im Serum. n=43. C: Korrelation zwischen Calprotectin-Werten und der miR-223-Expression im Serum. n=39. D: Korrelation zwischen CRP-Werten und der miR-16-Expression im Stuhl. n=49. E: Korrelation zwischen CRP-Werten und der miR-223-Expression im Stuhl. n=49. F: Korrelation zwischen Calprotectin-Werten und der miR-223-Expression im Stuhl. n=40.

Die Analyse wurde durchgeführt mittels Spearman-Korrelationsanalyse. CRP in mg/l, fäkales Calprotectin (FC) in $\mu\text{g/g}$. Für Serum wurde die relative miRNA-Expression, normalisiert auf cel-miR-39 mithilfe der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Methode, verwendet. Für Stuhl wurden die Rohwerte verwendet.

3.4. Analyse potentieller Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression

In diesem Abschnitt folgt die systematische Analyse verschiedener potentieller Einflüsse auf die miRNA-Expression. Die Ergebnisse werden in vier Schritten vorgestellt.

- 1) Einfluss der Stuhlextraktionsmenge auf die miRNA-Expression im Stuhl
- 2) Einfluss von Blutbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl
- 3) Einfluss von Serumbeimengungen (z.B. bei möglichen Barrierestörungen) auf die miRNA-Expression im Stuhl
- 4) Systematische Stabilitätsanalyse von miRNA im Stuhl

Für diesen Zweck wurden die homogenisierten Stuhlproben von fünf Probanden volumengleich und systematisch entsprechend dem Protokoll aliquotiert und portioniert.

3.4.1. Einfluss der Stuhlextraktionsmenge auf die miRNA-Expression im Stuhl

Zu Beginn wurde untersucht, inwiefern die Stuhlmenge einen Einfluss auf die miRNA-Extraktion und entsprechend auf die Präzision der Messung hat (Abb. 15). Dafür wurde aus den homogenisierten Stuhlproben in den Mengen 25µl, 50µl und 100µl Stuhl zunächst die miRNA extrahiert und anschließend jeweils für miR-16 und miR-21 analysiert. Mit steigendem Stuhlvolumen konnten wir in Korrelation steigende miRNA-Werte nachweisen.

Zunächst untersuchten wir die nicht normalisierten Rohwerte (Abb. 15A und B). Es lag für beide untersuchten miRNAs ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen 25µl und 100µl Stuhl vor (für miR-16 $p=0,0085$; für miR-21 $p=0,0008$ im Friedman-Test). Es erfolgte ebenso eine Auswertung der auf cel-miR-39 normalisierten Expressionswerte von miR-16 (Abb. 15C) und miR-21 (Abb. 15D). Hierbei zeigten sich ebenfalls für miR-16 sowie für miR-21 signifikante Expressionsunterschiede zwischen 25µl und 100µl Stuhl. 100µl Stuhlprobe ergab eine etwa 6,6fach höhere miR-16-Expression als 25µl ($3,4 \cdot 10^{-3}$ ($1,4 \cdot 10^{-3}$; $1,3 \cdot 10^{-2}$) vs. $4,6 \cdot 10^{-4}$ ($2,1 \cdot 10^{-4}$; $1,1 \cdot 10^{-3}$)). Für miR-21 war die Expression von 100µl Stuhl sogar ca. 11,2fach höher als von 25µl Stuhl ($1,1 \cdot 10^{-2}$ ($3,4 \cdot 10^{-3}$; $3,7 \cdot 10^{-2}$) vs. $8,9 \cdot 10^{-4}$ ($3,8 \cdot 10^{-4}$; $2,3 \cdot 10^{-3}$)). Unabhängig davon, ob die ursprünglichen Ct-Werte auf cel-miR-39 normalisiert oder die Rohdaten untersucht wurden, zeigten die miRNAs eine höhere Expression bei 100µl als bei 25µl Stuhl.

Da in früheren Studien miR-16 zur Normalisierung verwendet wurde [41,91], untersuchten wir, zu welchem Ergebnis eine Normalisierung von miR-21 auf miR-16 führt (Abb. 15E).

Wir fanden heraus, dass bei einer Normalisierung von miR-21 auf miR-16, wie sie in anderen Studien bereits häufig durchgeführt wurde, keine Expressionsunterschiede unabhängig von der verwendeten Stuhlmenge vorlagen.

Insgesamt bekräftigen diese Resultate die präanalytische Genauigkeit der miRNA-Messungen. Die Menge von Stuhlproben sollte jedoch bei den Analysen möglichst gleichmäßig verwendet werden, da sie einen Einfluss auf die gemessene miRNA-Expression hat. Diese Ergebnisse bestätigen zwar die Eignung von miR-16 zur Normalisierung von unauffälligen/gesunden Stuhlproben, sie wären jedoch gegebenenfalls bei Personen mit Diarrhoe mit Verzerrungen assoziiert.

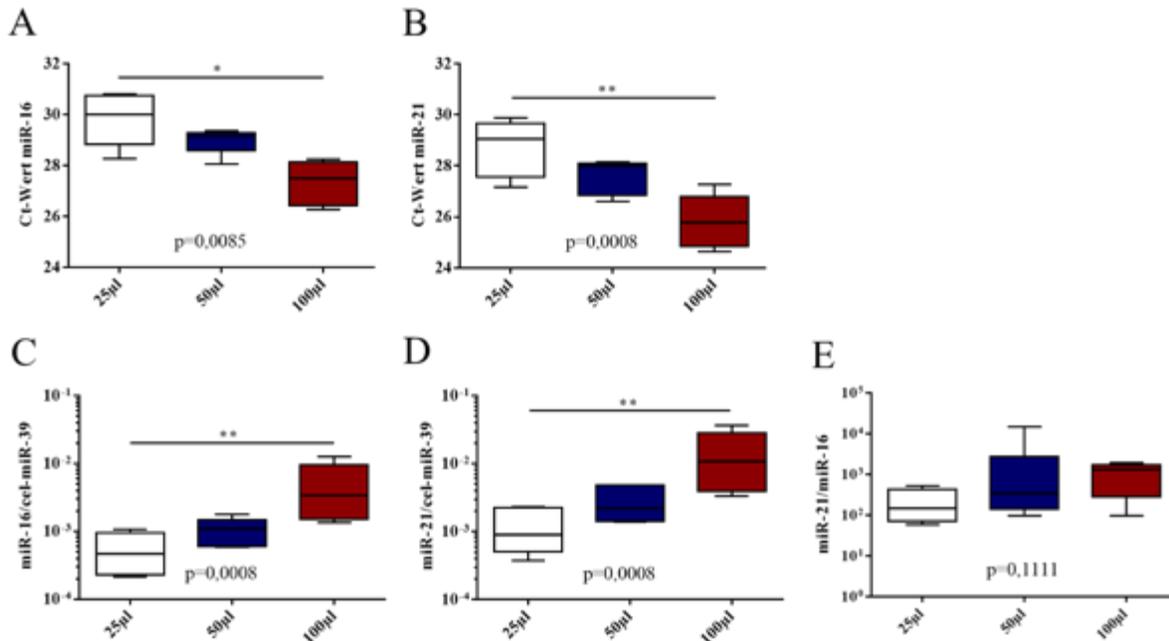


Abb. 15: Einfluss der Stuhlextraktionsmenge auf die miRNA-Expression im Stuhl.

A: Darstellung der miR-16-Expression. B: Darstellung der miR-21-Expression. C: Darstellung der relativen miR-16-Expression, normalisiert auf cel-miR-39. D: Darstellung der relativen miR-21-Expression, normalisiert auf cel-miR-39. E: Darstellung der relativen miR-21-Expression, normalisiert auf miR-16.

Es wurden jeweils die Stuhl-Extraktionsmengen 25µl (weiß), 50µl (blau) und 100µl (rot) bei einer Probenanzahl von n=5 untersucht. Eine Normalisierung erfolgte mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Friedman-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 dargestellt.

3.4.2. Einfluss von Blutbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl

In vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit KRK veränderte und meist höhere miRNA-Expressionen als Kontrollen aufweisen [91–93]. Ähnlich wie für KRK sahen wir auch in unserer Arbeit höhere Expressionen der miRNA im Stuhl von CED-Patienten, vor allem bei Patienten mit aktiver Erkrankung. Es ist beispielsweise bekannt, dass Erythrozyten sehr hohe miR-16-Konzentrationen aufweisen [98]. Bei unseren Untersuchungen der Stuhlproben von CED-Patienten stellten wir hohe Expressionen von miR-16 fest, was vermuten lässt, dass Blut einen deutlichen Einfluss auf die Expression haben könnte. Um zu untersuchen, ob Blut einen Einfluss auf die miRNA-Expression im Stuhl haben könnte, entwickelten wir ein Modell, in welchem wir Stuhl und EDTA-Blut in unterschiedlichen Konzentrationen miteinander vermischt und anschließend die miRNA-Expression darin untersucht haben (Abb. 16). Für diesen Zweck nutzten wir beispielhaft folgende Stuhl- und Blutverhältnisse: 100% Stuhl vs. 90% Stuhl/10% Blut vs. 50% Stuhl/50% Blut vs. 100% Blut. Für dieses Experiment wählten wir miR-16

aufgrund ihres hohen Gehaltes im Blut und miR-21 wegen ihrer bisher größten Bedeutung in der Karzinogenese aus. So konnten wir beobachten, dass bereits kleine Beimengungen von Blut zu Stuhl zu einem deutlichen Anstieg der miR-16- und miR-21-Expression führten. Die höchste Konzentration war in den Blutproben und die geringste in den Stuhlproben zu finden. Sie war bei miR-16 deutlich stärker ausgeprägt als bei miR-21 (Abb. 16).

Diese Veränderungen waren sowohl bei den nicht normalisierten Werten (Ct-Werte) als auch bei den Proben, zu denen cel-miR-39 dazugegeben und auf diese Referenz-miRNA normalisiert wurde, zu sehen. Die Auswertung der relativen Expressionsänderung ergab eine etwa 30573,6fach höhere miR-16-Expression von 100% EDTA-Blut im Vergleich zu 100% Stuhl (114,6 (61; 226) vs. $4,2 \cdot 10^{-3}$ ($1,7 \cdot 10^{-3}$; $1,6 \cdot 10^{-2}$)) (Abb. 16C). Für miR-21 konnte eine ca. 106,9fach höhere Expression von der EDTA-Blutprobe verglichen mit der Stuhlprobe verzeichnet werden ($7 \cdot 10^{-1}$ ($3,8 \cdot 10^{-1}$; 2) vs. $7,6 \cdot 10^{-3}$ ($2,4 \cdot 10^{-3}$; $2,8 \cdot 10^{-2}$)) (Abb. 16D).

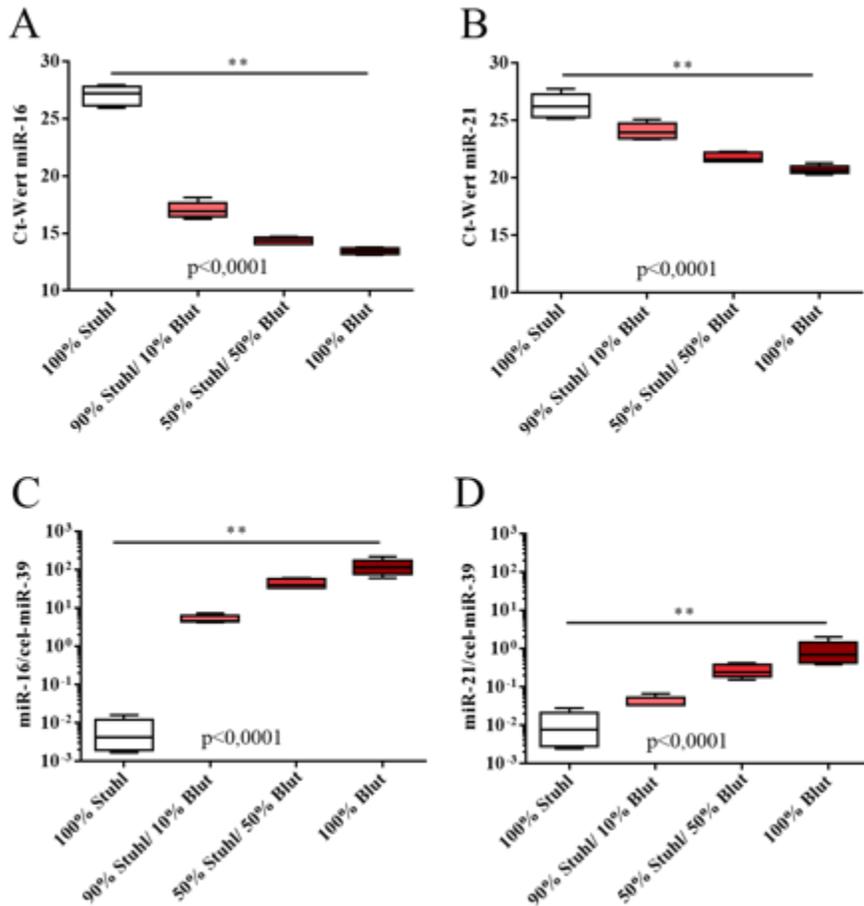


Abb. 16: Einfluss von Blutbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl.

A: Darstellung der miR-16-Expression. B: Darstellung der miR-21-Expression. C: Darstellung der relativen miR-16-Expression, normalisiert auf cel-miR-39. D: Darstellung der relativen miR-21-Expression, normalisiert auf cel-miR-39.

Es wurde die Expression in Stuhl (weiß) und EDTA-Blut (dunkelrot), sowie in den Stuhl-Blut-Gemischen in den Verhältnissen 90% Stuhl/ 10% EDTA-Blut (rosa) und 50% Stuhl/ 50% EDTA-Blut (hellrot) bei einer Probenanzahl von $n=5$ untersucht. Eine Normalisierung erfolgte mithilfe der $2^{\Delta Ct}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Friedman-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

3.4.3. Einfluss von Serumbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl

Auf ähnlicher Art und Weise wie beim Blut verglichen wir den Einfluss von Blutserum auf die miRNA-Expression im Stuhl. Auch hier verfolgten wir die Hypothese, dass Serum einen potentiellen Einflussfaktor auf die miRNA-Expression im Stuhl darstellen könnte. Hier wurde ein ähnliches Konzept wie oben beschrieben angewandt, jedoch wurden zur besseren Übersichtlichkeit nur jeweils 100% Stuhl und Serum, sowie jeweils 50% Stuhl und Serum verwendet (Abb. 17).

Obwohl die miR-16 eine etwas höhere Expression in gemischten Proportionen zeigte, waren die Veränderungen zwischen den 100%-Proben nicht vorhanden. Nach der Normalisierung war jedoch die miR-16-Expression in der 100% Serumprobe höher als im Stuhl. Eine etwas andere Tendenz sahen wir bei der miR-21-Analyse. Hier waren sowohl in der Auswertung der nicht normalisierten Werte als auch in den auf cel-miR-39 normalisierten Daten signifikant höhere miR-21-Expressionen im Stuhl als im Serum nachweisbar (Abb. 17B und D).

Die miR-16-Expression im Serum war ca. 6,7fach höher als im Stuhl ($2 \cdot 10^{-2}$ ($1,3 \cdot 10^{-2}$; $4,1 \cdot 10^{-2}$) vs. $4,2 \cdot 10^{-3}$ ($1,7 \cdot 10^{-3}$; $1,6 \cdot 10^{-2}$)), die miR-21-Expression im Stuhl hingegen war ca. 8,8fach höher als im Serum $7,6 \cdot 10^{-3}$ ($2,4 \cdot 10^{-3}$; $2,8 \cdot 10^{-2}$) vs. ($4,8 \cdot 10^{-4}$ ($4 \cdot 10^{-4}$; $8,6 \cdot 10^{-4}$) (Anl. 1).

Zusammenfassend lässt sich, basierend auf diesen einfachen, jedoch sehr aussagekräftigen Experimenten, feststellen, dass bereits geringe Blutbeimengungen im Stuhl zu deutlichen Veränderungen in der miRNA-Expression im Stuhl beitragen können. Dies kann, abhängig davon, welcher Bestandteil des Blutes vorliegt (Serum oder Vollblut), zu komplexen bzw. heterogenen Veränderungen führen. Diese Experimente legen nahe, dass miR-16 bei entzündlichen Veränderungen des Darmes nicht zur Normalisierung der Proben verwendet werden kann.

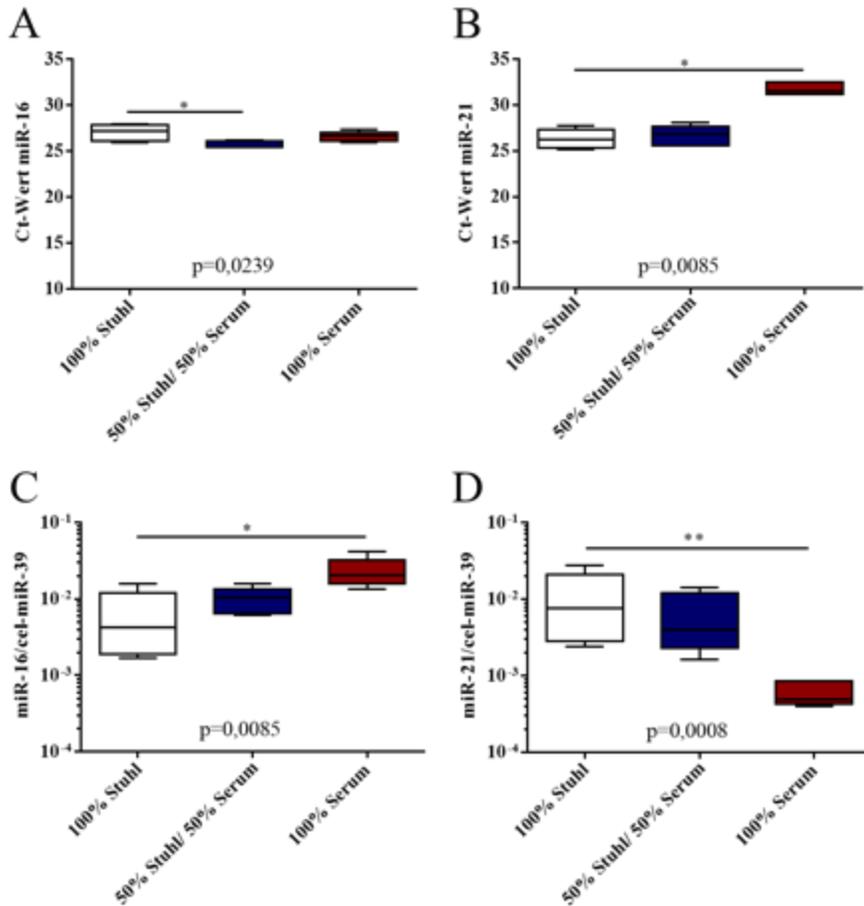


Abb. 17: Einfluss von Serumbeimengungen auf die miRNA-Expression im Stuhl.

A: Darstellung der miR-16-Expression. B: Darstellung der miR-21-Expression. C: Darstellung der relativen miR-16-Expression, normalisiert auf cel-miR-39. D: Darstellung der relativen miR-21-Expression, normalisiert auf cel-miR-39.

Es wurde die Expression in Stuhl (weiß) und Serum (rot), sowie im Stuhl-Serum-Gemisch im Verhältnis 50% Stuhl/ 50% Serum (blau) bei einer Probenanzahl von $n=5$ untersucht. Eine Normalisierung erfolgte mithilfe der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Friedman-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ dargestellt.

3.4.4. Systematische Stabilitätsanalyse von miRNA im Stuhl

Stuhlproben beinhalten viele aktive Enzyme. Dennoch wurde früher berichtet, dass miRNAs eine gute Stabilität aufweisen [90]. Diese untersuchten wir systematisch, indem ausgewählte Stuhlproben aufbereitet und anschließend für 14 Tage bis zur miRNA-Isolation bei verschiedenen Temperaturstufen gelagert wurden. Durch die Verdünnung der Proben mit Wasser vor der Lagerung, kommt es zur Aktivierung der Verdauung durch Enzyme. Die Lagerungstemperaturen wurden wie folgt gewählt: -80°C , erst -80°C und nach 24 Stunden (h) -30°C , -30°C , 4°C und 20°C (Abb. 18). In der Rohdatenauswertung ergaben sich für miR-16 deutliche

Expressionsunterschiede zwischen der Lagerung auf -80°C und 4°C sowie zwischen -80°C und 20°C (Abb. 18A). Die Untersuchung der miR-21-Expression ergab ebenfalls einen erheblichen Unterschied zwischen der Lagerung auf -80°C und 4°C (Abb. 18B). Das Einfrieren der aufbereiteten Stuhlproben (bei $-30^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$) scheint daher bedeutend zu sein. In der Auswertung der auf cel-miR-39 normalisierten Ct-Werte ergab sich für miR-16 ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen der Lagerung auf -80°C und 20°C ($6 \cdot 10^{-3}$ ($5,5 \cdot 10^{-4}$; 4,3) vs. $1,5 \cdot 10^{-3}$ ($9,1 \cdot 10^{-6}$; $7,7 \cdot 10^{-2}$); 6,5fach; entsprechend $p=0,0244$) (Abb. 18C und Anl. 1). Die Auswertung der relativen miR-21-Expression (Abb. 18D) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Temperaturen.

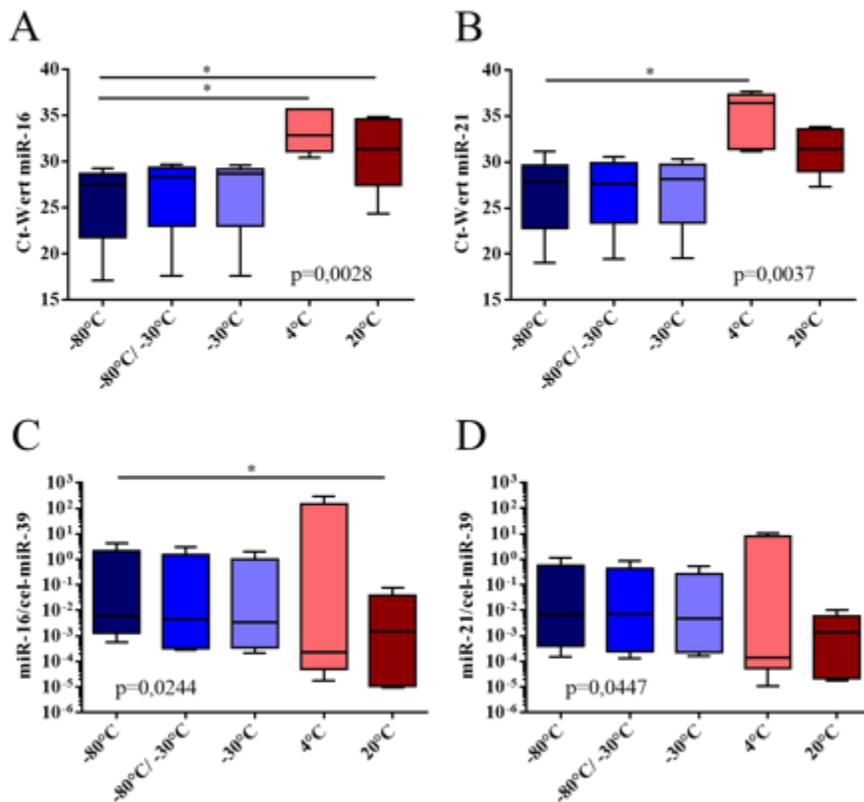


Abb. 18: Systematische Stabilitätsanalyse von miRNA im Stuhl.

A: Darstellung der miR-16-Expression. B: Darstellung der miR-21-Expression. C: Darstellung der relativen miR-16-Expression, normalisiert auf cel-miR-39. D: Darstellung der relativen miR-21-Expression, normalisiert auf cel-miR-39.

Es wurden folgende Temperaturstufen bei einer Probenanzahl von $n=5$ untersucht: -80°C (dunkelblau), erst -80°C , dann nach 24 Stunden (h) -30°C (stahlblau), -30°C (hellblau), 4°C (rosa), 20°C (rot). Eine Normalisierung erfolgte mithilfe der $2^{\Delta\text{Ct}}$ -Methode. Die Analyse wurde durchgeführt mittels Friedman-Test und Dunn's Post-hoc-Test. Die Signifikanz (*) wurde als * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ dargestellt.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde das Potential von miRNAs im Serum und im Stuhl als mögliche Biomarker in der Diagnostik chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen systematisch evaluiert. Wie bereits einleitend erläutert, mangelt es aktuell noch an verlässlichen diagnostischen Biomarkern in CED.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass Patienten mit CED Veränderungen von mehreren miRNAs, wie z.B. miR-16, miR-21, miR-155 und miR-223, in Serum und Stuhl aufweisen. Die Expressionsveränderungen im Serum waren bei CD-Patienten höher und korrelierten mit der Erkrankungsaktivität, während die miRNA-Veränderungen im Serum von UC-Patienten nur marginal waren. Die Analyse von fäkalen Proben ergab deutlich höhere Unterschiede in den miRNA-Veränderungen als die Analyse der Serumproben. Sowohl Stuhlproben von CD- als auch UC-Patienten waren im Vergleich zu Kontrollen mit einer starken Zunahme der miRNA-Expression assoziiert. Eine klinische Remission bei CED-Patienten ging zumindest teilweise mit einer Normalisierung, besonders der fäkalen miRNA-Expression, einher. Außerdem zeigten fäkale miRNA-Expressionsveränderungen eine Korrelation mit dem FC- und CRP-Wert. Die miRNAs miR-16, miR-155 und miR-223 können als nützliche fäkale Marker für weitere Analysen betrachtet werden.

4.1. miRNA-Veränderung im Gewebe und Limitationen

In den letzten Jahren wurden wesentliche Erkenntnisse gewonnen, die nahelegen, dass miRNAs eine bedeutende Rolle in CED spielen könnten [99]. In einer Studie von Wu et al. wurde erstmals ein verändertes miRNA-Expressionsprofil in Gewebeproben von aktiv erkrankten UC-Patienten im Vergleich zu Kontrollproben sowie zu Proben von Patienten in Remission entdeckt. Die stärksten Änderungen in der Expression UC-assoziiierter miRNAs in humanem Kolongewebe wiesen miR-192 und miR-21 auf. Dabei war miR-192 in UC-Gewebeproben signifikant herunterreguliert und miR-21 im Vergleich zu gesunden Kontrollen stark erhöht exprimiert, wie auch miR-16 in geringerer Ausprägung [81]. Die Entnahme von Gewebebiopsien stellt eine invasive Methode dar. Für die Probenentnahme muss der Patient abführen, es sind Instrumente wie ein Koloskop notwendig und die Durchführung ist zeit- und kostenaufwendig. Seit langer Zeit besteht ein Interesse an der Identifikation eines nicht-invasiven Biomarkers. Daher wurden in den letzten Jahren auch Studien zu zirkulierenden miRNAs durchgeführt.

4.2. Auswahl der miRNAs

In dieser Studie wählten wir anhand von vorangegangenen Studien bestimmte miRNAs zur Untersuchung unserer Fragestellung aus. Insbesondere für unsere vier untersuchten miRNAs wurden in früheren Studien differentielle Expressionen in CED-Gewebeproben gefunden [82,83,100]. Gazouli et al. erstellten anhand der Zitationsfrequenz und der Konkordanz von Expressionstrends mit dem korrespondierenden erkrankten Gewebe eine Liste der bedeutendsten zirkulierenden miRNAs in CED im Hinblick auf ihre Verwendung als potentielle Biomarker. Dabei stellten sich für CD unter anderem miR-16 und miR-21 im Blut und Serum als am aussichtsreichsten dar. Für UC wurden miR-16, miR-21 und miR-155 im Blut als Erfolg versprechend für den Einsatz als Biomarker gelistet [75].

4.2.1. miR-16

MiR-16 wird eine Rolle in der Regulierung von Entzündungsprozessen und in der Einleitung der Apoptose zugeschrieben [76]. Insgesamt kann in Studien zu zirkulierender miRNA in CED häufig eine Überexpression der miR-16 im Vergleich von Proben von CD-Patienten und Kontrollen beobachtet werden [76,77,101]. Die Korrelation mit der Erkrankungsaktivität demonstriert das Potential von miR-16 in ihrer Funktion als Biomarker [76]. Diese Ergebnisse werden durch unsere Resultate gestützt, in denen sich deutliche Expressionsveränderungen in Serumproben sowohl zwischen aktiv erkrankten CD-Patienten und Kontrollen als auch zwischen aktiven CD-Patienten und solchen in Remission zeigen. Auch in unserer Analyse der Stuhlproben waren starke Expressionsänderungen der miR-16 nachweisbar. Für unsere Studie wurde miR-16 jedoch initial hauptsächlich für den Einsatz zur Normalisierung der Stuhlproben ausgewählt, wofür sie sich aufgrund der ausgeprägten Expressionsschwankungen letztlich nicht eignete, worauf in Abschnitt 4.8.1 näher eingegangen wird.

4.2.2. miR-21

Wir wählten miR-21 für unsere Studie aus, da sie als häufigste dysregulierte miRNA in Krebserkrankungen [102] und entzündlichen Erkrankungen [103] gilt. Es wurde eine erhöhte Expression von miR-21 in verschiedenen T-Zell-Typen festgestellt [104]. MiR-21 fungiert als Onkogen und moduliert die Tumorgenese durch die Regulation von Genen, wie z.B. Bcl-2 [105]. Eine Überexpression von miR-21 in Kolonbiopsien von UC-Patienten scheint im Weiteren die epitheliale Barrierefunktion durch eine Regulation von RhoB zu beeinträchtigen [106]. Shi et al. assoziierten eine miR-21-Überexpression mit einer intestinalen Entzündung und Gewebeschädigung. Eine

abgeschwächte Expression könnte daher potentiell einem Ausbruch oder einer Progression chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen entgegenwirken [103]. Zusätzlich zur epithelialen Barrierefunktion spielt miR-21 auch eine Rolle in intestinalen Fibroseprozessen und in der erworbenen Immunantwort [4].

4.2.3. miR-155

Takagi et al. identifizierten eine Überexpression von miR-21 und erstmals auch von miR-155 in entzündeten Gewebeproben des Kolons von aktiv erkrankten UC-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen [100]. MiR-155 nimmt eine Schlüsselrolle im angeborenen und erworbenen Immunsystem ein und ist ein entscheidender Regulationsfaktor in der B- und T-Zelldifferenzierung und -funktion. Es wurde besonders in Lymphozyten und in myeloischen Zellen ein Vorhandensein und eine regulatorische Funktion von miR-155 nachgewiesen [107]. In unserer Studie konnte die fäkale miR-155 sehr gut zwischen aktiv erkrankten CD-Patienten und Kontrollen als auch, wie von Takagi et al. für Gewebeproben beschrieben [100], zwischen aktiv erkrankten UC-Patienten und Kontrollen differenzieren.

4.2.4. miR-223

Iborra et al. fanden heraus, dass die Expression im Serum von miR-223 in UC im Vergleich zur Kontrolle sowie, analog zu unseren Ergebnissen, von miR-16 in CD im Vergleich zur Kontrolle signifikant verändert war [76]. Gemäß unseren Resultaten war miR-223 mit einer etwa 8,5fach höheren Expression der beste untersuchte Serummarker für die Unterscheidung aktiv erkrankter CD-Patienten im Vergleich zu Serumproben von Kontrollprobanden. MiR-223 ist in neutrophilen Granulozyten stark exprimiert [108]. Sie spielt eine entscheidende Rolle in der Granulopoese [109] und agiert als Feinregulierer in der Granulozytenproduktion und der Entzündungsantwort [108]. Daher ist es nicht überraschend, dass in den meisten Studien zum Thema miRNAs im Gewebe und Serum, Veränderungen der miR-223 beschrieben werden. Schaefer et al. führten Untersuchungen an IL-10-ausgeknockten Mäusen durch und fanden heraus, dass miR-223 als negativer Regulator des Proteins Roquin (Rc3h1) agiert, welches wiederum die IL-17a-vermittelte Entzündung reguliert. Laut der Resultate ihrer Studie könnte miR-223 als allgemeiner Marker der lokalen, intestinalen Entzündung dienen [110]. Unsere Annahme, dass miR-223 potentiell als vielversprechender CED-Serumbiomarker eingesetzt werden könnte, wurde durch das Resultat einer kürzlich veröffentlichten Studie von Wang et

al. unterstrichen. Demnach schienen ausgewählte miRNAs im Serum, wie miR-223, verlässlicher und von höherem prognostischen Wert als andere serologische Marker zu sein [111]. Polyarchou et al. identifizierten vier zirkulierende miRNAs, darunter auch miR-223, welche mit der Erkrankungsaktivität in UC-Patienten korrelierten [112].

4.3. Zirkulierende miRNAs

Es wird vermutet, dass die meisten zirkulierenden miRNAs ihren Ursprung in Blutkomponenten (z.B. in Erythrozyten) und Endothelzellen haben [113]. In früheren Studien wurde festgestellt, dass die Messung der zirkulierenden miRNA-Menge durch variierende Konzentrationen zellulärer miRNAs der verschiedenen hämatopoetischen Zellen beeinflusst werden kann [98,114] und sich das miRNA-Expressionsmuster somit vom intestinalen Gewebe unterscheidet [80]. Zunehmende Evidenz belegt, dass die miRNA-Expression im Plasma und Serum die Veränderungen in der Mukosa, wie beispielsweise in der Karzinogenese, widerspiegelt [72].

Die miRNAs im Blut können nach aktuellem Kenntnisstand in unterschiedlichen Formen vorkommen. Es ist bekannt, dass zirkulierende miRNAs in Mikrovesikeln [115], in *High-Density-Lipoproteinen* (HDL) [116], und im Komplex mit Proteinen, wie dem AGO2-Protein [117], welches eine zentrale Rolle im miRNA-vermittelten *Silencing* spielt, vorkommen und transportiert werden. Der miRNA-Bindung an Vesikel und besonders an AGO2 wird der Grund für ihre hohe Stabilität gegenüber dem RNase-reichen Blut zugeschrieben. Die Stabilität der miRNA-Expression gegenüber Pathologien ist von besonderer Bedeutung für den Einsatz zur Normalisierung, da sich bei einer Beeinflussung der zur Normalisierung verwendeten miRNA eine Verfälschung der gemessenen miRNA-Expression ergeben kann [118]. Es wurde außerdem herausgefunden, dass ein Exosom-vermittelter Transfer von miRNAs die Kommunikation und den genetischen Austausch zwischen Zellen ermöglicht [119]. Pigati et al. beschrieben die mögliche Existenz eines zellulären Selektionsmechanismus der miRNA-Freisetzung und vermuteten einen Unterschied zwischen extrazellulärem und zellulärem miRNA-Expressionsprofil. Sie beobachteten, dass Zellen miRNAs selektiv freisetzen oder intrazellulär behalten können, und das Vorkommen von extrazellulären miRNAs daher zumindest partiell unabhängig von zellulären miRNAs betrachtet werden könnte, da es nicht unbedingt das zelluläre Profil widerspiegelt [120].

Einige wenige CED-Studien verwendeten für die Beurteilung der miRNA-Expression Vollblut [77,80]. Eine Vollblutprobe (EDTA-Blut) hat jedoch den Nachteil, dass durch die dominante Erythrozytenzahl eine deutliche Überblendung der anderen miRNAs erfolgt, sodass potentielle inflammatorische miRNAs stark von erythrozytären miRNAs überstrahlt werden [41,98,114]. Wir entschieden uns daher

für die Untersuchung von Serumproben.

Bei der Analyse von Serum gibt es einige Herausforderungen; eine davon ist die Normalisierung. Auch wenn es keine humanen miRNAs zur Normalisierung gibt, kann die sehr gut etablierte Methode der Verwendung von cel-miR-39 als Referenz-miRNA angewandt werden. Dies ist eine miRNA der Gattung *Caenorhabditis elegans*, mit Abwesenheit von homologen Sequenzen im Menschen. Es handelt sich um eine synthetische Referenz-miRNA, welche in Studien schon häufig als externe Kontrolle eingesetzt wurde und als hierfür geeignet gilt [72,121,122]. Die Referenz-miRNA cel-miR-39 wird ähnlich wie die zu untersuchenden miRNAs beeinflusst und dient zum Ausgleich der technischen Extraktionsvariabilität [122,123]. Auch in unserer Auswertung stellte sie eine zufriedenstellende Methode zur Normalisierung dar, da wir eine konstante Expression beobachten konnten.

4.4. miRNA-Expression im Serum bei CED-Patienten

Übereinstimmend mit der aktuellen Datenlage, konnten wir Veränderungen der miRNA-Expression im Serum von CED-Patienten feststellen. In unserer Studie lagen Expressionsunterschiede für miR-16, miR-21 und miR-223 sowohl zwischen CED- und Kontroll-Serumproben als auch zwischen CD- und UC-Serumproben vor. In einer Studie von Zahm et al., welche Proben von rektaler Mukosa und Serum von pädiatrischen Patienten verglichen, war die miR-21-Expression in Serumproben von CED-Patienten ebenfalls höher als in Kontrollen [124]. In unserer Auswertung fiel auf, dass miR-16, miR-21, miR-155 und miR-223 eine signifikante Expressionserhöhung im Vergleich von aktiven CD-Serumproben und Kontrollen zeigten. Anhand von miR-155 und miR-16 war zudem eine höhere Expression in aktiv erkrankten CD-Patienten im Vergleich zu Patienten in Remission zu beobachten. Im Gegensatz dazu war keine signifikante Expressionsänderung im Vergleich von aktiven UC-Serumproben und Kontrollen zu sehen. Die Ursache dafür könnte beispielsweise an der mukosalen Inflammation in UC im Vergleich zur transmuralen Entzündung in CD liegen. Es ließen sich dennoch signifikante Expressionsänderungen in UC für miR-21 und miR-155 zwischen aktiv Erkrankten und Patienten in Remission nachweisen. Nichtsdestotrotz wurde anhand unserer Untersuchungen deutlich, dass in der Analyse der Serumproben die Daten mit der meisten Beständigkeit die Auswertung der CD-Proben zeigten, während UC nur leichte Veränderungen ergab.

Iborra et al. untersuchten Gewebe und Serum von CD- und UC-Patienten im aktiven und inaktiven Erkrankungsstadium. Sie fanden in ihrer Studie Expressionsunterschiede im Serum zwischen aktivem und inaktivem CD, jedoch nicht zwischen aktiver und inaktiver UC. Stattdessen konnten sie ein überlappendes erhöhtes Expressionsmuster von zwölf miRNAs im Serum von CD- und UC-Patienten

nachweisen. Sie vermuteten, dass die erhöhte Expression in aktiv Erkrankten Ausdruck einer generellen Entzündung sein könnte, da die identifizierten miRNAs teilweise auch in anderen Autoimmunerkrankungen verändert vorgefunden wurden [76]. Eine andere Gruppe, Dalal et al., wies in CD und UC veränderte Expressionen nach, welche überwiegend nicht identisch mit miRNAs waren, welche in anderen autoimmunen Erkrankungen überexprimiert vorlagen. Sie vermuteten daher, dass die Überexpression wahrscheinlich eher zum einzigartigen Pathomechanismus dieser Erkrankungen beitrage, als dass sie nur Ausdruck einer generalisierten Entzündungsantwort ist. Sie nehmen außerdem an, dass ein unterschiedliches miRNA-Expressionsmuster zwischen akutem und chronischen Entzündungszustand vorliegt. Anzumerken ist allerdings, dass Dalal et al. kein Serum, sondern Gewebe und Vollblut untersuchten [125]. In einer Studie von Zahm et al. wurden elf CD-assoziierte miRNAs im Serum von Kindern, darunter miR-16 und miR-21, mit hoher Sensitivität und Spezifität und somit hohem diagnostischen Potential beschrieben. Alle untersuchten miRNAs waren in Kindern mit CD höher exprimiert als in Kontrollen. Sie postulieren, dass jede einzelne Komponente in der komplexen Pathogenese der CED, wie der Lymphozyteninfiltration in den Darm, Epithelzellschäden und verschiedenste Entzündungsvorgänge, zu erhöhten zirkulierenden miRNA-Konzentrationen führen kann [101]. Wir können diese Hypothese mit den Ergebnissen unseres Stuhl-Serum-Proportionstests stützen, da aufgrund von Barrierestörungen miRNA-Expressionsveränderungen möglich sind. Zahm et al. vermuteten außerdem, dass die CD-assoziierten miRNAs als Marker für ein therapeutisches Ansprechen fungieren könnten, da zumindest bei zwei der untersuchten miRNAs eine signifikante Reduktion nach 6-monatiger medikamentöser Behandlung erzielt werden konnte [101]. Der potentielle Einfluss einer Therapie sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. In unserer Arbeit wurden miRNA-Veränderungen aufgrund einer speziellen Therapie von CD oder UC nicht untersucht. Wir konnten jedoch zeigen, dass eine Remission mit einer Reduktion der miRNA-Expression einhergeht. Insgesamt bestätigen unsere Studienergebnisse das Potential von zirkulierenden miRNAs als diagnostisches Instrument in CED-Patienten.

4.5. miRNA-Expression im Stuhl bei CED-Patienten

Die größten Bestrebungen, miRNAs als Biomarker und insbesondere für CED, einzusetzen, wurden bisher für den Einsatz von zirkulierenden miRNAs gemacht. Die fäkale miRNA-Expression könnte jedoch ein noch präziseres Instrument für die Evaluierung der Erkrankungsaktivität und die Mukosaheilung sein, da Stuhl als Probenart viele Vorteile bietet. Im Stuhl sind die miRNAs, welche ihren Ursprung in intestinalen Epithelzellen haben, direkt am entzündeten Gewebe lokalisiert [41,94].

Die Möglichkeit des Nachweises von miRNAs im Stuhl stand im Fokus einiger vorangegangener Studien zum Thema KRK [91], Pankreaskarzinom [90] und zu John Cunningham Virusmodellen [126], wozu kürzlich auch erst ein Review veröffentlicht wurde [41].

In unserer Auswertung der CED-Stuhlproben waren miR-16, miR-155 und miR-223 von CD- und UC-Proben jeweils signifikant höher exprimiert als in der jeweiligen Kontrollgruppe. Im Vergleich der gesamten CED-Kohorte mit der Kontrollgruppe zeigten sogar alle vier untersuchten miRNAs eine signifikant höhere Expression in den CED-Stuhlproben. MiR-223, besser noch als miR-16 und miR-155, schien für die Unterscheidung von aktiv Erkrankten und Kontrollen geeignet, da sie die höchste miRNA-Konzentration und die stärksten Expressionsunterschiede aufwies. Fäkale miR-16 und miR-223 eigneten sich zudem für die Unterscheidung aktiv erkrankter CED-Patienten von Patienten in Remission. Die Erkrankungsaktivität hat demnach einen bedeutenden Einfluss auf die miRNA-Expression in Stuhlproben. Der insgesamt beste von uns untersuchte fäkale Marker, um Patienten mit CD und besonders auch mit UC, im akuten Erkrankungsschub von Patienten in Remission und von Kontrollen zu unterscheiden, war somit miR-223, gefolgt von miR-16.

Zu fäkalen miRNAs gab es in Bezug auf CED bisher erst eine Veröffentlichung, jedoch primär mit Fokus auf das KRK. Ahmed et al. konnten 2009 in ihrer Studie über die miRNA-Expression im Gewebe und im Stuhl von Patienten mit KRK und aktiver CED zeigen, dass unter anderem miR-16 und miR-21 im Stuhl von UC-Patienten, nicht jedoch von CD-Patienten, höher als in Kontrollproben exprimiert waren. Da der primäre Fokus der Arbeit auf dem KRK gelegen hat und insgesamt deutliche Unterschiede im Studiendesign bestanden, ist ein Vergleich zu unserer Studie nur eingeschränkt möglich. Methodisch unterscheiden sich die Studien insbesondere auch in der Normalisierung. Ahmed et al. verwendeten 18S rRNA als interne Kontrolle, welche Verzerrungen, wie z.B. einer Degradierung, unterliegen könnte [89]. In unserer Studie wurde eine Volumen-basierte Normalisierung, aus Gründen, auf die in Abschnitt 4.8.1 eingegangen wird, durchgeführt. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass bestimmte miRNAs im Stuhl vielversprechendes Potential für nicht-invasive CED-Diagnostik besitzen.

4.6. Korrelation von miRNAs in verschiedenen Probenarten und mit laborchemischen Parametern

Für die Evaluierung der Erkrankungsaktivität in CED-Patienten finden der CRP- und FC-Wert häufig Anwendung. Trotz des signifikanten Zusammenhangs mit der Erkrankungsaktivität, korrelierten lediglich die fäkale miR-16 und miR-223, nicht jedoch zirkulierende miRNAs, mit Surrogatparametern wie dem FC- und dem CRP-Wert. Eine Erklärung dafür könnten die in Stuhlproben signifikanteren

Expressionsunterschiede im Hinblick auf die Erkrankungsaktivität als in Serumproben sein. Außerdem lagen für die Subgruppenanalysen der vier untersuchten miRNAs für die fäkale miR-16 und miR-223 die höchsten Expressionsunterschiede vor. Ebenso wie der FC-Wert gehen die fäkalen miRNAs mit dem Ausmaß der Entzündungsaktivität einher. Im Gegensatz dazu korrelieren die systemischen miRNAs aus dem Blut nicht mit der Mukosaheilung. Der CRP-Wert als serologischer Marker ist ebenso unspezifisch, da er zwar eine Entzündung im Körper identifizieren kann, nicht aber den Ort des Geschehens [29]. Iborra et al. vermuteten eine Korrelation zwischen der miRNA-Expression im Gewebe und der Expression zirkulierender miRNAs aufgrund eines Einflusses der Entzündung in CED über die Mukosa hinaus, was daraufhin zu einer systemischen Reaktion führen könnte [76]. Mit unserer Studie konnten wir jedoch darlegen, dass Serumproben im Gegensatz zu Stuhlproben nicht mit CRP als serologischer Parameter und FC als fäkaler Marker der Mukosaheilung korrelieren. Ebenso lag keine Korrelation zwischen der Expression der jeweiligen miRNA im Serum und im Stuhl vor. Auch Zahm et al. untersuchten in einem *Profiling* die miRNA-Expression in rektalen Mukosa-Biopsien verglichen mit Serumproben von pädiatrischen CED-Patienten. In Korrelation zu unseren Resultaten im Serum konnten sie eine erhöhte miR-21-Expression sowohl im Gewebe als auch im Serum von CED-Patienten im Vergleich zu Kontrollen nachweisen. Die miRNA-Konzentrationen in Gewebeproben aus dem Rektum und im Serum korrelierten jedoch nicht miteinander [124]. Die Hypothese der Beeinflussung von fäkaler miRNA durch eine Entzündung im Darm wird in Zusammenschau unserer Studienergebnisse mit früheren Studien zu miRNAs in CED-Gewebeproben gestützt. Entzündliche Veränderungen des Darms induzieren vermutlich frühzeitiger und intensiver die miRNA-Veränderungen im Stuhl als systemisch im Serum. Im Kontext gastrointestinaler Erkrankungen erscheint es daher sinnvoll, die miRNA-Expression auch im Stuhl zu untersuchen, wobei ein fäkaler Biomarker ebenso wie ein Serummarker leicht zu gewinnen, günstig und nicht-invasiv wäre.

Die Korrelation der fäkalen miRNA-Expression mit FC und CRP unterstreicht die potentielle Überlegenheit von miRNAs im Stuhl im Vergleich zu miRNAs im Serum für den Einsatz als Biomarker. Im Rahmen der Auswertung entstand die Vermutung, dass eine Kombination aus fäkalen miRNAs, CRP- und FC-Werten möglicherweise zu einer höheren Treffsicherheit in der Diagnostik führen könnte.

4.7. Mögliche Ursachen für differentielle miRNA-Expressionen

Vorangegangene Studien stützen die Vermutung, dass das miRNA-Expressionsmuster in der Mukosa einerseits abhängig von der Lokalisation ist, wo die Biopsie entnommen wurde, und andererseits CD

und UC aufgrund der unterschiedlichen Pathophysiologie verschiedene miRNA-Expressionsmuster aufweisen [127,128]. Wu et al. demonstrierten, dass Gewebeproben aus dem Ileum eine Überexpressionen von miR-16, miR-21, miR-223 und miR-594, die in Proben aus dem Kolon nicht nachweisbar waren, ergaben. MiR-16 und miR-21 zeigten eine überlappende Überexpression von ilealen CD- und UC-Proben [82]. Unterschiede in der miRNA-Expression suggerieren zudem, dass manche miRNAs spezifisch für chronisch dysregulierte Immunantworten und andere eher nur allgemeiner Ausdruck einer akuten Entzündung sind [5,125]. Fasseu et al. beschrieben, dass dysregulierte miRNAs, welche bereits in inaktiver Mukosa von CED-Patienten in Remission präexistieren, für den Ausbruch und Rückfall der Entzündung eine entscheidende Rolle spielen und an der Anfälligkeit für CED beteiligt sein könnten. Sie verdeutlichten, dass sich die miRNA-Expression erkrankungs- und aktivitätsspezifisch verändern kann. Beispielsweise war die Expression von miR-223 in ihrer Studie bei UC-Patienten mit entzündeter Mukosa und bei CD-Patienten mit nicht entzündeter Mukosa im Vergleich zu gesunden Kontrollbiopsien signifikant überexprimiert. Laut dieser Studie zeigt miR-223 daher in UC und CD, je nach Erkrankungsaktivität, unterschiedliche Expressionsveränderungen [83]. MiR-21 und miR-155 waren in der Studie von Fasseu et al. sowohl bei entzündeter als auch nicht entzündeter Mukosa von CD-Patienten signifikant überexprimiert. Das heißt, in dieser Studie könnten die miRNA-Veränderungen für miR-21 und miR-155 in Gewebeproben von CD-Patienten nicht mit der Erkrankungsaktivität, sondern vorrangig mit der Art der Erkrankung assoziiert sein [83]. Wie auch Fasseu et al., welche eine Überexpression von miR-26a und miR-29a in entzündeter und nicht entzündeter Mukosa in Gewebeproben von CD- und UC-Patienten identifizierten, beobachteten Wu et al. ebenfalls eine Überexpression dieser zwei miRNAs in UC-Proben mit und ohne entzündeter Mukosa [81].

Unsere Ergebnisse der Blut- und Serumbeimengungen zum Stuhl unterstreichen die Annahme, dass die miRNA-Veränderungen mit einer gestörten Barriere, bedingt durch Inflammation und Mikroblutungen, assoziiert sein könnten. Da sowohl in CD als auch UC entzündliche Veränderungen vorliegen, ist es nicht erstaunlich, dass wir in unserer Auswertung eine starke Expressionszunahme in beiden Erkrankungen beobachten konnten. Basierend auf unseren Ergebnissen bezweifeln wir, dass eine der von uns untersuchten miRNAs zur Unterscheidung von CD und UC in Serum oder Stuhl hilfreich sein könnte. Für diesen Zweck sind weitere Studien mit Durchführung eines *Profiling*s notwendig.

4.8. Methodologische Einflussfaktoren auf die miRNA-Expressionsanalyse

Für die Untersuchung der miRNA-Expression in Stuhlproben liegen noch keine standardisierten

Methoden vor. Daher haben wir uns kritisch mit diesem Thema auseinandergesetzt und verschiedene methodologische Einflussfaktoren untersucht. Im folgenden Abschnitt werden Auswirkungen von verschiedenen Stuhlmengen, Blut- und Serumbeimengungen zum Stuhl und der Lagerungstemperatur der Stuhlproben auf die miRNA-Expression diskutiert und erläutert.

4.8.1. Normalisierung der Stuhlproben

In früheren Studien wurden unterschiedliche Referenz-miRNAs zur Normalisierung verwendet. Es gibt bisher jedoch keinen Goldstandard. Unsere Gruppe hat im Voraus aber zeigen können, dass endogene miR-16 eine relativ stabile Expression im Stuhl zeigt [91]. Sie wurde außerdem bereits in zahlreichen Studien zu zirkulierenden miRNAs und miRNAs im Gewebe als Referenz-miRNA verwendet und galt bisher als etablierte interne Kontrolle [96,121,129]. Interessanterweise erhöht sich die Expression von miR-16 deutlich in hämolytischen Proben [123]. Zudem wurde sie als eine der häufigsten miRNAs im Plasma vorgefunden [113]. Dies ist von kritischer Bedeutung für ihren Einsatz zur Normalisierung in Studien zu zirkulierenden miRNAs. Bisher ist man jedoch von einer relativ stabilen miR-16-Expression im Stuhl ausgegangen und hat diese miRNA auch im Stuhl zur Normalisierung verwendet [91]. Aufgrund dieser Annahme haben auch wir diese miRNA in unsere Messungen eingeschlossen und ursprünglich zur Normalisierung der Stuhlproben ausgewählt. Überraschenderweise fiel jedoch in der Analyse der fäkalen miR-16 eine deutliche Überexpression der CED-Proben im Vergleich zu den Kontrollen auf. Daher war eine Verwendung von miR-16 als Referenz-miRNA nicht möglich bzw. sinnvoll. Wir verwarfen auch die Überlegung, eine bakterielle RNA zur Normalisierung zu verwenden, da sich daraus, aufgrund der veränderten mikrobiellen Flora in CED-Patienten, weitere Verzerrungen ergeben könnten. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie mit Rohwerten gearbeitet. Um Unterschiede zu minimieren, wurden annähernd ähnliche Stuhlvolumina verwendet. Aus unserer Sicht wird die Normalisierung möglicherweise eine Herausforderung darstellen und bedarf einer systematischen Analyse.

4.8.2. Herkunft der miRNAs im Stuhl

Die fäkale miRNA-Expression kann im Vergleich zur Expression zirkulierender miRNA aufgrund der lokalen Veränderungen, wie beispielsweise der Abschilferung von Zellen, der Produktion von Exosomen und Veränderungen an der Mukosabarriere, ein akkurateres Werkzeug für die Evaluierung der Erkrankungsaktivität oder der Mukosaheilung in gastrointestinalen Erkrankungen sein [41,94].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich Stuhlproben wesentlich besser als Serumproben in der CED-Diagnostik eignen, da in unserer Auswertung die fäkalen miRNAs von CED-Patienten einen deutlich stärkeren Expressionsunterschied im Vergleich zu Kontrollproben als die Serumproben aufwiesen. Ebenso war die Änderung in der Expression in Stuhlproben von Patienten mit aktiver Erkrankung im Vergleich zu solchen in Remission und im Vergleich zur Kontrolle wesentlich deutlicher ausgeprägt als in Serumproben. Für diese Ergebnisse ziehen wir folgende Erklärungsansätze in Betracht: Der Stuhl hat im Darm direkt Kontakt zur Mukosa. Dort finden Abschilferungen aus Darmepithelzellen der Mukosa statt, welche neben Proteinen auch miRNAs enthalten, die mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Daher erscheinen fäkale miRNAs in gastrointestinalen Erkrankungen die geeigneteren Marker der Erkrankungsaktivität und der Mukosaheilung zu sein als zirkulierende miRNAs. In vorangegangenen Studien wurden miRNA-Expressionsveränderungen im Gewebe aus Darmbiopsien von CED-Patienten festgestellt [81–83]. Aufgrund des Vorhandenseins abgeschilfter Darmepithelzellen im Stuhl [94] müssten sich differentielle miRNA-Expressionsprofile, welche in früheren Studien im Gewebe aus Darmbiopsien von CED-Patienten nachgewiesen wurden, in Stuhlproben widerspiegeln. Die miRNA-Expression im Stuhl müsste der Expression aus Gewebeproben daher ähnlicher sein, als die Expression im Blut. Liu et al. erbrachten hierzu kürzlich einen Nachweis. Mithilfe eines zell-spezifischen Verlustes des Enzyms Dicer, welches einen essentiellen Bestandteil in der miRNA-Biogenese darstellt, fanden sie heraus, woher fäkale miRNAs stammen. Diese wurden zum überwiegenden Teil in Darmepithelzellen, Paneth-Körnerzellen und Becherzellen nachgewiesen. Sie beschrieben weiterhin, dass miRNAs in Bakterien eindringen können, deren Genexpression und Wachstum regulieren können und als natürliche Stuhlbestandteile essentiell für die Erhaltung der normalen Darmflora sind. Beispielsweise konnten sie zeigen, dass ein Mangel an miRNAs, welche von Epithelzellen ausgehen, zu einer vielfältigeren Darmflora und einer veränderten Integrität der Darmbarriere führt. In den Dicer-Knockout-Mäusen wurde eine Exazerbation der Kolitis im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen beobachtet. Dies unterstreicht die Bedeutung der physiologischen Rolle von miRNAs in der Prägung der Darmflora [94].

4.8.3. miRNA-Expression in verschiedenen Stuhlmengen

Bislang gibt es kein etabliertes Normalisierungsverfahren für Stuhlproben. Daher untersuchten wir, ob verschiedene Stuhlvolumina einen Einfluss auf die miRNA-Extraktion haben. In früheren Studien wurden beispielsweise endogene miRNAs mit stabiler Expression [91] oder synthetische *spiked-in* miRNAs als Referenz-miRNAs [122] zur Normalisierung verwendet.

Bei unserer Untersuchung der Stuhl-Extraktionsmenge konnten wir für miR-16 und miR-21 zeigen, dass eine lineare Korrelation besteht; je höher das Stuhlvolumen, desto höher lag auch die miRNA-Expression. Daraus lässt sich schließen, dass das Stuhlvolumen einen Einfluss auf die miRNA-Detektion und -Quantifizierung hat. Aus unserer Sicht ist das ein gutes Ergebnis, denn es bestätigt, dass in mehr Stuhlvolumen auch mehr miRNAs vorliegen und man somit relativ gut quantifizieren kann. Interessanterweise konnten wir nach einer Normalisierung auf miR-16, wie es für Gesunde als Referenz-miRNA verwendet wird bzw. wurde [91], keinen Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen Stuhlvolumina mehr feststellen. Dieses Ergebnis unterstreicht die gute Eignung von Stuhlvolumen bzw. miR-16 in Gesunden zur Normalisierung im Stuhl. Vergleichbare Studien zur Untersuchung der Stuhlextraktionsmenge wären von besonderer Relevanz für die Anwendung von fäkalen miRNAs als Biomarker in der klinischen Praxis. Zukünftige Studien sind notwendig, um das optimale Extraktionsvolumen zu finden.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für unsere Untersuchung der miRNAs im Stuhl von CED-Patienten eine Volumen-basierte Normalisierung mit annähernd gleichen Extraktionsvolumina angewandt. Für die Analyse der methodologischen Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression haben wir cel-miR-39 hinzugefügt und ähnliche Ergebnisse wie bei der Rohwertanalyse erhalten.

4.8.4. miRNA-Expression in Stuhl, Blut und Serum

Eine aktive Darmentzündung bei Patienten mit CED ist neben einer inflammatorischen Zellinfiltration auch mit Mikroblutungen assoziiert. Aus diesem Grund stellten wir die Hypothese auf, dass Blut einen möglichen Einfluss auf die miRNA-Expression haben könnte. Um das zu untersuchen, führten wir einen simplen, jedoch sehr anschaulichen Test durch. Dafür wurden Stuhl- und Blutproben in unterschiedlichen Konzentrationen vermischt. Wir bemerkten in unserer Analyse, dass miR-21, und ganz besonders miR-16, im Vollblut eine enorm höhere miRNA-Expression im Vergleich zu reinem Stuhl aufwies. Blutbeimengungen im Stuhl haben daher nachweislich einen sehr entscheidenden Einfluss auf die miRNA-Expression im Stuhl. Auch wenn es für Signifikanzen nicht immer ausgereicht hat, zeigen die Ergebnisse starke Expressionsunterschiede zwischen Stuhl und EDTA-Blut in den verschiedenen Mischungsverhältnissen. Ursächlich für die ausbleibenden Signifikanzen können das nicht-parametrische Testverfahren und die geringe Probenanzahl sein. Betrachtet man die einzelnen miRNAs, so lag die Expression von miR-16 im Serum etwas höher als im Stuhl und von miR-21 im Serum etwas niedriger als im Stuhl. Dies ist erklärt durch die hohe Expression von miR-16 in Erythrozyten [98] und dem reichlichen Vorkommen von miR-21 in Mukosazellen [81,82,124], was das

vermehrte Vorkommen im Stuhl erklärt. Insgesamt waren die Expressionen im Serum und Stuhl aber sehr viel geringer als im EDTA-Blut. Neben dem starken Expressionsunterschied von Blut und Stuhl liegt demnach ebenso ein deutlicher Unterschied zwischen der Expression im Vollblut und Serum vor. Zusammenfassend belegt dieses Experiment, dass die miRNA-Veränderungen im Stuhl zumindest partiell auf die Integrität der Mukosa und den Kontakt mit Blut zurückzuführen sind.

4.8.5. miRNA-Stabilität im Stuhl

Trotz erster Berichte gibt es noch wenige systematische Daten über die miRNA-Stabilität im Stuhl. Unsere Gruppe konnte kürzlich eine relativ stabile miRNA-Expression in der Langzeitlagerung von Stuhlproben nachweisen [90]. Auch Kalimutho et al. und Wu et al. untersuchten die miRNA-Stabilität in Stuhlproben in ihren Studien zum KRK und erlangten vielversprechende Daten [92,93]. In unserem Temperaturstabilitätstest der Stuhlproben wurde für die Rohdatenauswertung der miR-21 ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen einer Stuhlprobenlagerung auf -80°C im Vergleich zu 4°C nachgewiesen. Diese Signifikanz war in der Auswertung der normalisierten miRNA aufgrund von Abweichungen nicht mehr nachweisbar. Für miR-16 lag ein Unterschied in der Expression sowohl zwischen -80°C und 20°C als auch zwischen -80°C und 4°C in der Rohdatenauswertung vor. In der Literatur wird teilweise eine komplette Robustheit, zumindest von zirkulierenden miRNAs, gegenüber verschiedensten Temperaturen beschrieben [129]. Für unsere untersuchten Stuhlproben schien zumindest eine Lagerung bei -30°C im Vergleich zu -80°C zu keiner nennenswerten Degradierung der miRNA in der Probe zu führen. Das Einfrieren der Proben (bei $-30^{\circ}\text{C}/ -80^{\circ}\text{C}$) im Vergleich zur Kühlung (4°C) erscheint jedoch bedeutend (vgl. Abb. 18). Analog zu unseren Ergebnissen im Stuhl ist auch für zirkulierende miRNAs bekannt, dass sie zwar deutlich stabiler als RNAs sind, ein Einfrieren der Proben im Vergleich zur einfachen Kühlung (4°C) aber trotzdem empfohlen wird, um Degradierungserscheinungen zu limitieren [121,130]. Einen beeinflussenden Faktor auf die Stabilität stellt sicherlich die Probenverarbeitung dar. Es ist zu beachten, dass die Stuhlproben vor der Lagerung für die technische Vergleichbarkeit in Wasser homogenisiert wurden. Somit lagen die Proben nicht mehr im Originalzustand vor, was beispielsweise eine Aktivierung der RNase fördern könnte. Insgesamt unterstreichen unsere Resultate die außerordentliche Stabilität von miRNAs im Stuhl gegenüber endogener RNase-Aktivität, wie sie beispielsweise auch im Plasma nachgewiesen wurde [72,117].

4.9. Limitationen der Arbeit

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Machbarkeitsstudie, welche das Konzept der miRNA-Expression im Serum und Stuhl als potentielle Biomarker für CED untersucht. Dabei ist zu beachten, dass wir kein *miRNA-Profilung* durchführten, sondern lediglich die Expression vier ausgewählter miRNAs untersuchten. Es ist davon auszugehen, dass durchaus auch andere miRNAs im Stuhl und Serum von CED-Patienten verändert sein können. Der Vorteil unserer Methode ist allerdings, dass wir die untersuchten miRNAs aufgrund von Erfahrungen aus anderen Studien, gezielt für unsere Studie auswählten und somit potentielle Verzerrungen durch ein ungezieltes Screening einer großen Anzahl von miRNAs reduzierten.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist außerdem zu beachten, dass sich die Studien methodisch unterscheiden. Die Normalisierung stellt einen bedeutenden Aspekt für die Interpretation und Vergleichbarkeit der Ergebnisse dar. Aufgrund der erheblichen Expressionsunterschiede von miR-16 und ihrer starken Expression im Blut bzw. in Erythrozyten [98] konnte diese miRNA für unsere Studie nicht zur Normalisierung der Stuhlproben eingesetzt werden. Dies ist eine neue Erkenntnis und zum jetzigen Zeitpunkt steht keine weitere geeignete Normalisierung zur Verfügung. Um diese Limitation zu umgehen, nutzten wir eine Volumen-basierte Normalisierung. Für eine optimale Quantifizierung und Vergleichbarkeit der Daten wird eine weitere systematische Suche nach einem potentiellen Referenzgen zur Normalisierung notwendig sein. Aus den Erkenntnissen der Daten von CED-Patienten im Serum wurde *cel-miR-39* versuchsweise in der Analyse der Einflussfaktoren auf die miRNA-Expression im Stuhl als Referenz-miRNA verwendet, um technische Abweichungen auszugleichen. In Zusammenschau der Ergebnisse schien die Normalisierung hiermit eine mögliche Methode der Wahl darzustellen. Eine denkbare Limitierung besteht jedoch hinsichtlich Stuhlkonzentrationen bei Diarrhoe. Wir verwendeten für unsere Studie zum Teil prospektiv gesammelte, zum Teil bereits bestehende Patientenproben und -daten. Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns waren nicht alle Labordaten für die Korrelation verfügbar. Weiterhin war nur eine begrenzte Menge an Proben verfügbar, denen es partiell an Information zum mukosalen bzw. histologischen Status fehlte, um die Erkrankungsaktivität zu beurteilen. In Zukunft werden weitere prospektive Studien notwendig sein, um o.g. Limitationen zu umgehen und offene Fragen zu beantworten.

4.10. Ausblick

Wir haben nachgewiesen, dass miRNAs im Stuhl, vermutlich durch den direkten Einfluss der Mukosa und deren entzündliche Prozesse, mehr Expressionsunterschied im Vergleich zu Kontrollen zeigen als

im Serum und sich potentiell als nicht-invasive diagnostische Biomarker in CED eignen könnten. Im nächsten Schritt sind Studien mit größeren Studienpopulationen und einem *Profiling* der Proben zur Beurteilung der miRNA-Expression im Stuhl bei CED-Patienten notwendig, um das diagnostische Benefit in der Therapieüberwachung zu evaluieren. Außerdem sollten weitere Forschungsarbeiten die Mechanismen der miRNA-Freisetzung, ihre Herkunft im Stuhl und potentielle Einflussfaktoren auf ihre Expression noch intensiver untersuchen. Um neue Biomarker in der klinischen Praxis zu etablieren, werden einheitliche Protokolle für die Probengewinnung, -lagerung und -verarbeitung sowie für die Verwendung von Extraktionskits und für die Datennormalisierung benötigt.

Da miRNAs in Krankheiten oft dysreguliert sind, stellen sie, abgesehen von ihrem möglichen Einsatz in der Diagnostik, auch ein potentielles Ziel in der Therapeutik dar. Dabei sind einige Strategien für die Modulierung der miRNA-Aktivität beschrieben. Es besteht beispielsweise die Option der Wiederherstellung der miRNA-Funktion über eine synthetische miRNA (miRNA-*mimics*) oder über virale Expressionskonstrukte. Zudem kann die Funktion der miRNAs über chemisch modifizierte AntimiR-Oligonukleotide (AMO) inhibiert werden [131]. Da die miRNA-Expression zell- und gewebespezifisch ist [132], würde bei einem potentiellen Einsatz in der Therapeutik das Risiko von Nebeneffekten in nicht erkrankten Zellen bestehen. Dies erfordert die Erforschung von Strategien, die miRNAs direkt an den Zielort zu applizieren und die optimal modifizierte Aktivität zu bestimmen [131]. Ferner stellt die Methodik der Stuhltransplantation eine interessante Therapiestrategie dar. Im Rahmen einer murinen Stuhltransplantation mit Stuhl von Wildtyp-Mäusen in Dicer-knock-out Mäuse fanden Liu et al. heraus, dass die Transplantation von fäkaler miRNA bei der Wiederherstellung der Darmflora und der Ausheilung einer Kolitis helfen könnte [94]. Aus klinischer Sicht wäre für die Beurteilung fäkaler miRNAs außerdem eine simultane Studie zur Untersuchung des Gewebes mit Berücksichtigung der Mukosaheilung sinnvoll, da diese das Therapieziel darstellt.

Da die Erkrankungsaktivität in unserer Studie anhand von klinischen Scores und nicht basierend auf Histologie, Endoskopie oder FC als Surrogatparameter für die Darmentzündung kalkuliert wurde, führten wir anschließend noch eine Validierung durch. Wir schlossen eine unabhängige Kohorte mit ein, in welcher FC und die Endoskopie genutzt wurden, um die Erkrankungsaktivität zu bestimmen. Die Ergebnisse waren sehr gut reproduzierbar (siehe Publikation).

Wir konnten mit unserer Arbeit das vielversprechende Potential von miRNAs im Serum und im Stuhl als nicht-invasive diagnostische Biomarker der Erkrankungsaktivität in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bestätigen und empfehlen in diesem Kontext ihre weitere Erforschung.

5. Zusammenfassung

Die Einschätzung der Krankheitsaktivität ist für ein angemessenes Therapiemanagement der CED von großer Bedeutung. Symptom-basierte Einteilungen der Erkrankungsaktivität sind für den Nachweis der Mukosaheilung als primäres Therapieziel nicht ausreichend verlässlich, da sie nicht suffizient mit einer endoskopischen und histologischen Abheilung korrelieren. Neue nicht-invasive molekulare Biomarker, wie die funktionell aktiven und häufig im entzündlichen Gewebe dysregulierten miRNAs, könnten das Therapiemanagement erheblich erleichtern. In dieser Studie wurde das Potential von ausgewählten zirkulierenden und fäkalen miRNAs als diagnostische Biomarker für CED mittels quantitativer RT-PCR evaluiert. Es wurden Serum- und Stuhlproben von Patienten mit diagnostizierter CED, im akuten Schub der CD oder UC oder in Remission, gesammelt und mit einer Kontrollgruppe verglichen. Wir konnten zeigen, dass die Serumproben von CED-Patienten eine erhöhte Expression von miR-16, miR-21 und miR-223 im Vergleich zu Kontrollproben aufweisen. In Subgruppen-Analysen konnten wir eine Korrelation zwischen Krankheitsaktivität und vorliegender Erkrankung feststellen. Die miRNA-Expression war in Patienten mit CD und klinisch aktiver Erkrankung höher als bei Patienten in Remission. Insgesamt zeigten die Proben von Patienten mit CD die höchste miRNA-Expression für drei miRNAs im Vergleich zu den Kontrollen und zu UC-Patienten. Noch eindrucksvoller konnten wir die Veränderungen im Stuhl demonstrieren. So zeigten die miRNA-Veränderungen im Stuhl von CED-Patienten mit aktiver Entzündung eine starke Zunahme der Expression aller untersuchten miRNAs und zwar auch bei Patienten mit UC. Eine klinische Remission bei CED-Patienten war mit einer Normalisierung der fäkalen miRNA-Expression assoziiert. Trotz der Korrelation zwischen miRNA-Expression und Erkrankungsaktivität korrelierte lediglich fäkale miRNA, nicht jedoch zirkulierende miRNA, mit Surrogatparametern wie dem fäkalen Calprotectin oder dem CRP-Wert. Weiterhin konnten wir in systematischen Analysen von miRNA-Einflussfaktoren zeigen, dass fäkale miRNA eine gute Korrelation zwischen der Stuhlmenge und Veränderungen der miRNA-Expression belegen. In einem einfachen, aber sehr anschaulichen Modell konnten wir belegen, dass eine Beimengung von Blut (wie z.B. bei einer Kolitis) einen starken Einfluss auf die miRNA-Expression hat und die Stuhl-miRNA-Veränderungen zum Teil darauf zurückzuführen sind. Zusammenfassend konnten unsere Daten einen Beitrag zur Biomarker-Forschung leisten, indem sie neue Evidenz für eine differentielle Expression von miRNAs im Serum und im Stuhl von CED-Patienten erbringen. Diese Arbeit liefert wichtige und neuartige Erkenntnisse über mögliche Ursachen von miRNA-Veränderungen im Stuhl und schafft eine Basis zur weiteren Erforschung von miRNAs als diagnostisches Instrument in CED-Patienten.

Literaturverzeichnis

- [1] Baumgart DC, Carding SR: Inflammatory bowel disease. Cause and immunobiology. *The Lancet*. 369. pp. 1627–1640 (2007).
- [2] Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD: Regional ileitis. *The American Journal of Medicine*. 13. pp. 583–590 (1952).
- [3] Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG: Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 142. pp. 46 (2012).
- [4] Chapman CG, Pekow J: The emerging role of miRNAs in inflammatory bowel disease: a review. *Therapeutic advances in gastroenterology*. 8. pp. 4–22 (2015).
- [5] Archanioti P, Gazouli M, Theodoropoulos G, Vaiopoulou A, Nikiteas N: Micro-RNAs as regulators and possible diagnostic bio-markers in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 5. pp. 520–524 (2011).
- [6] Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, Lee JC, Schumm LP, Sharma Y, Anderson CA, Essers J, Mitrovic M, Ning K, Cleynen I, Theatre E, Spain SL, Raychaudhuri S, Goyette P, Wei Z, Abraham C, Achkar J-P, Ahmad T, Amininejad L, Ananthakrishnan AN, Andersen V, Andrews JM, Baidoo L, Balschun T, Bampton PA, Bitton A, Boucher G, Brand S, Büning C, Cohain A, Cichon S, D'Amato M, Jong D de, Devaney KL, Dubinsky M, Edwards C, Ellinghaus D, Ferguson LR, Franchimont D, Fransen K, Geary R, Georges M, Gieger C, Glas J, Haritunians T, Hart A, Hawkey C, Hedl M, Hu X, Karlsten TH, Kupcinskis L, Kugathasan S, Latiano A, Laukens D, Lawrance IC, Lees CW, Louis E, Mahy G, Mansfield J, Morgan AR, Mowat C, Newman W, Palmieri O, Ponsioen CY, Potocnik U, Prescott NJ, Regueiro M, Rotter JI, Russell RK, Sanderson JD, Sans M, Satsangi J, Schreiber S, Simms LA, Sventoraityte J, Targan SR, Taylor KD, Tremelling M, Verspaget HW, Vos M de, Wijmenga C, Wilson DC, Winkelmann J, Xavier RJ, Zeissig S, Zhang B, Zhang CK, Zhao H, Silverberg MS, Annesse V, Hakonarson H, Brant SR, Radford-Smith G, Mathew CG, Rioux JD, Schadt EE, Daly MJ, Franke A, Parkes M, Vermeire S, Barrett JC, Cho JH: Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 491. pp. 119–124 (2012).
- [7] Abraham C, Cho JH: Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine*. 361. pp. 2066–2078 (2009).
- [8] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411. pp. 599–603 (2001).
- [9] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 411. pp. 603–606 (2001).
- [10] Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega, Francisco M, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S: A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics*. 39. pp. 207–211 (2007).

- [11] Cho JH, Weaver CT: The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 133. pp. 1327–1339 (2007).
- [12] Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Cardon L, Mathew CG: Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nature genetics*. 39. pp. 830–832 (2007).
- [13] Goyette P, Boucher G, Mallon D, Ellinghaus E, Jostins L, Huang H, Ripke S, Gusareva ES, Annese V, Hauser SL, Oksenberg JR, Thomsen I, Leslie S, Daly MJ, van Steen K, Duerr RH, Barrett JC, McGovern DPB, Schumm LP, Traherne JA, Carrington MN, Kosmoliaptsis V, Karlsen TH, Franke A, Rioux JD: High-density mapping of the MHC identifies a shared role for HLA-DRB1*01:03 in inflammatory bowel diseases and heterozygous advantage in ulcerative colitis. *Nature genetics*. 47. pp. 172–179 (2015).
- [14] Legaki E, Gazouli M: Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 7. pp. 112–125 (2016).
- [15] Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS: Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology*. 28. pp. 573–621 (2010).
- [16] Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, Satsangi J: MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*. 64. pp. 504–517 (2015).
- [17] Vucelic B: Inflammatory bowel diseases: controversies in the use of diagnostic procedures. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 27. pp. 269–277 (2009).
- [18] Antoni L, Nuding S, Wehkamp J, Stange EF: Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 20. pp. 1165–1179 (2014).
- [19] Preiss JC, Bokemeyer B, Buhr HJ, Dignass A, Hauser W, Hartmann F, Herrlinger KR, Kaltz B, Kienle P, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Schreiber S, Siegmund B, Stallmach A, Stange EF, Stein J, Hoffmann JC: Aktualisierte S3-Leitlinie--"Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn" 2014. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 52. pp. 1431–1484 (2014).
- [20] Goldstein N, Dulai M: Contemporary morphologic definition of backwash ileitis in ulcerative colitis and features that distinguish it from Crohn disease. *American journal of clinical pathology*. 126. pp. 365–376 (2006).
- [21] Price AB: Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *Journal of clinical pathology*. 31. pp. 567–577 (1978).
- [22] Dignass A, Preiss JC, Aust DE, Autschbach F, Ballauff A, Barretton G, Bokemeyer B, Fichtner-Feigl S, Hagele S, Herrlinger KR, Jantschek G, Kroesen A, Kruis W, Kucharzik T, Langhorst J, Reinshagen M, Rogler G, Schleiermacher D, Schmidt C, Schreiber S, Schulze H, Stange E, Zeitz M, Hoffmann JC, Stallmach A: Aktualisierte Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Colitis ulcerosa 2011 - Ergebnisse einer Evidenzbasierten Konsensuskonferenz. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 49. pp. 1276–1341 (2011).
- [23] Romberg-Camps MJL, Dagnelie PC, Kester ADM, Hesselink-van de Kruijs, M A M, Cilissen M, Engels, L G J B, van Deursen C, Hameeteman WHA, Wolters FL, Russel, M G V M, Stockbrügger

- RW: Influence of phenotype at diagnosis and of other potential prognostic factors on the course of inflammatory bowel disease. *The American journal of gastroenterology*. 104. pp. 371–383 (2009).
- [24] Neumann H, Neurath MF, Mudter J: New endoscopic approaches in IBD. *World journal of gastroenterology*. 17. pp. 63–68 (2011).
- [25] Pagnini C, Menasci F, Desideri F, Corleto VD, Delle Fave G, Di Giulio E: Endoscopic scores for inflammatory bowel disease in the era of 'mucosal healing': Old problem, new perspectives. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 48. pp. 703–708 (2016).
- [26] Nelson DB, McQuaid KR, Bond JH, Lieberman DA, Weiss DG, Johnston TK: Procedural success and complications of large-scale screening colonoscopy. *Gastrointestinal endoscopy*. 55. pp. 307–314 (2002).
- [27] Panés J, Bouzas R, Chaparro M, García-Sánchez V, Gisbert JP, Martínez de Guereñu B, Mendoza JL, Paredes JM, Quiroga S, Ripollés T, Rimola J: Systematic review: the use of ultrasonography, computed tomography and magnetic resonance imaging for the diagnosis, assessment of activity and abdominal complications of Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 34. pp. 125–145 (2011).
- [28] Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, Colombel J-F, Hanauer SB, Rycroft B: Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 14. pp. 348-354.e17 (2016).
- [29] Soubières AA, Poullis A: Emerging role of novel biomarkers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*. 7. pp. 41–50 (2016).
- [30] Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel J-F, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF: Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*. 19 Suppl A. pp. 5–36 (2005).
- [31] Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel J-F: The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 55. pp. 749–753 (2006).
- [32] Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel J-F, Sands BE, Lukas M, Fedorak RN, Lee S, Bressler B, Fox I, Rosario M, Sankoh S, Xu J, Stephens K, Milch C, Parikh A: Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 369. pp. 711–721 (2013).
- [33] Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, van Assche G, Axler J, Kim H-J, Danese S, Fox I, Milch C, Sankoh S, Wyant T, Xu J, Parikh A: Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *The New England journal of medicine*. 369. pp. 699–710 (2013).
- [34] Althumairi AA, Lazarev MG, Gearhart SL: Inflammatory bowel disease associated neoplasia: A surgeon's perspective. *World journal of gastroenterology*. 22. pp. 961–973 (2016).
- [35] Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 48. pp. 526–535 (2001).

- [36] Jess T, Gamborg M, Matzen P, Munkholm P, Sørensen TIA: Increased risk of intestinal cancer in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based cohort studies. *The American journal of gastroenterology*. 100. pp. 2724–2729 (2005).
- [37] Baert F, Moortgat L, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Vos M de, Stokkers P, Hommes D, Rutgeerts P, Vermeire S, D'Haens G: Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology*. 138. pp. 463-8; quiz e10-1 (2010).
- [38] Peyrin-Biroulet L, Ferrante M, Magro F, Campbell S, Franchimont D, Fidler H, Strid H, Ardizzone S, Veereman-Wauters G, Chevaux J-B, Allez M, Danese S, Sturm A: Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO. I: Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 5. pp. 477–483 (2011).
- [39] Strimbu K, Tavel JA: What are biomarkers? Current opinion in HIV and AIDS. 5. pp. 463–466 (2010).
- [40] Aronson JK: Biomarkers and surrogate endpoints. *British journal of clinical pharmacology*. 59. pp. 491–494 (2005).
- [41] Link A, Goel A: MicroRNA in gastrointestinal cancer. A step closer to reality. *Advances in clinical chemistry*. 62. pp. 221–268 (2013).
- [42] Konikoff MR, Denson LA: Role of fecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 12. pp. 524–534 (2006).
- [43] Røseth AG, Aadland E, Grzyb K: Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 39. pp. 1017–1020 (2004).
- [44] Walsham NE, Sherwood RA: Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental gastroenterology*. 9. pp. 21–29 (2016).
- [45] Zittan E, Kelly OB, Kirsch R, Milgrom R, Burns J, Nguyen GC, Croitoru K, van Assche G, Silverberg MS, Steinhart AH: Low Fecal Calprotectin Correlates with Histological Remission and Mucosal Healing in Ulcerative Colitis and Colonic Crohn's Disease. *Inflammatory bowel diseases*. 22. pp. 623–630 (2016).
- [46] D'Haens G, Ferrante M, Vermeire S, Baert F, Noman M, Moortgat L, Geens P, Iwens D, Aerden I, van Assche G, van Olmen G, Rutgeerts P: Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 18. pp. 2218–2224 (2012).
- [47] Mooiweer E, Severs M, Schipper MEI, Fidler HH, Siersema PD, Laheij RJF, Oldenburg B: Low fecal calprotectin predicts sustained clinical remission in inflammatory bowel disease patients: a plea for deep remission. *Journal of Crohn's & colitis*. 9. pp. 50–55 (2015).
- [48] Kawashima K, Ishihara S, Yuki T, Fukuba N, Sonoyama H, Kazumori H, Yamashita N, Tada Y, Kusunoki R, Oka A, Oshima N, Mishima Y, Moriyama I, Kinoshita Y: Fecal Calprotectin More Accurately Predicts Endoscopic Remission of Crohn's Disease than Serological Biomarkers Evaluated Using Balloon-assisted Enteroscopy. *Inflammatory bowel diseases*. 23. pp. 2027-2034 (2017).
- [49] Kalantari H, Taheri A, Yaran M: Fecal calprotectin is a useful marker to diagnose ulcerative colitis from irritable bowel syndrome. *Advanced biomedical research*. 4. pp. 85 (2015).
- [50] Bushati N, Cohen SM: microRNA functions. *Annual review of cell and developmental biology*. 23. pp. 175–205 (2007).

- [51] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75. pp. 843–854 (1993).
- [52] Wightman B, Ha I, Ruvkun G: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 75. pp. 855–862 (1993).
- [53] Bartel DP: MicroRNAs. *Cell*. 116. pp. 281–297 (2004).
- [54] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*. 9. pp. 102–114 (2008).
- [55] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 466. pp. 835–840 (2010).
- [56] Ha M, Kim VN: Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15. pp. 509–524 (2014).
- [57] Asgari S: Role of MicroRNAs in Insect Host–Microorganism Interactions. *Front. Physio*. 2:48. (2011). doi:10.3389/fphys.2011.00048
- [58] Griffiths-Jones lab. miRBase: the microRNA database (Internet). <http://www.mirbase.org>, zuletzt geprüft am: 14.02.2018.
- [59] Friedman JM, Jones PA: MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss medical weekly*. 139. pp. 466–472 (2009).
- [60] Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 19. pp. 92–105 (2009).
- [61] Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH: MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell*. 30. pp. 460–471 (2008).
- [62] Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA: Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*. 318. pp. 1931–1934 (2007).
- [63] Zisoulis DG, Kai ZS, Chang RK, Pasquinelli AE: Autoregulation of microRNA biogenesis by *let-7* and *Argonaute*. *Nature*. 486. pp. 541–544 (2012).
- [64] Tang R, Li L, Zhu D, Hou D, Cao T, Gu H, Zhang J, Chen J, Zhang C-Y, Zen K: Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell research*. 22. pp. 504–515 (2012).
- [65] Zhang Y, Fan M, Zhang X, Huang F, Wu K, Zhang J, Liu J, Huang Z, Luo H, Tao L, Zhang H: Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. *RNA (New York, N.Y.)*. 20. pp. 1878–1889 (2014).
- [66] Mukherji S, Ebert MS, Zheng GXY, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A: MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nature genetics*. 43. pp. 854–859 (2011).
- [67] Stylianou E: Epigenetics: the fine-tuner in inflammatory bowel disease? *Current opinion in gastroenterology*. 29. pp. 370–377 (2013).
- [68] Saito Y, Jones PA: Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 5. pp. 2220–2222 (2006).
- [69] Miska EA: How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current opinion in genetics & development*. 15. pp. 563–568 (2005).

- [70] Iborra M, Bernuzzi F, Invernizzi P, Danese S: MicroRNAs in autoimmunity and inflammatory bowel disease: crucial regulators in immune response. *Autoimmunity reviews*. 11. pp. 305–314 (2012).
- [71] Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang C-Y: Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell research*. 18. pp. 997–1006 (2008).
- [72] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105. pp. 10513–10518 (2008).
- [73] Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sülthmann H: Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Molecular cancer*. 9. pp. 306 (2010).
- [74] Croce CM: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews. Genetics*. 10. pp. 704–714 (2009).
- [75] Gazouli M: Circulating microRNAs in Inflammatory Bowel Diseases. *Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and their Potential Biological Relevance*. Springer International Publishing Switzerland 2015. 106. pp. 197-214 (2015).
- [76] Iborra M, Bernuzzi F, Correale C, Vetrano S, Fiorino G, Beltrán B, Marabita F, Locati M, Spinelli A, Nos P, Invernizzi P, Danese S: Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology*. 173. pp. 250–258 (2013).
- [77] Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M: Circulating MicroRNA in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis*. 6. pp. 900–904 (2012).
- [78] Schütte K, Schulz C, Link A, Malfertheiner P: Current biomarkers for hepatocellular carcinoma: Surveillance, diagnosis and prediction of prognosis. *World journal of hepatology*. 7. pp. 139–149 (2015).
- [79] Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K: The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*. 56. pp. 1733–1741 (2010).
- [80] Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH: Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 17. pp. 241–250 (2011).
- [81] Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Brant SR, Chakravarti S, Kwon JH: MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*. 135. pp. 1624 (2008).
- [82] Wu F, Zhang S, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, Meltzer SJ, Brant SR, Kwon JH: Identification of microRNAs associated with ileal and colonic Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 16. pp. 1729–1738 (2010).
- [83] Fasseu M, Tréton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, Aparicio T, Daniel F, Soulé J-C, Moreau R, Bouhnik Y, Laburthe M, Groyer A, Ogier-Denis E: Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with

inflammatory bowel disease. PLoS ONE. 5. pp. e13160 (2010).

[84] Schaefer JS, Attumi T, Opekun AR, Abraham B, Hou J, Shelby H, Graham DY, Streckfus C, Klein JR: MicroRNA signatures differentiate Crohn's disease from ulcerative colitis. BMC immunology. 16. pp. 5 (2015).

[85] Zwiers A, Kraal L, van de Pouw Kraan, Tineke C T M, Wurdinger T, Bouma G, Kraal G: Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 188. pp. 1573–1577 (2012).

[86] Koukos G, Polytarchou C, Kaplan JL, Morley-Fletcher A, Gras-Miralles B, Kokkotou E, Baril-Dore M, Pothoulakis C, Winter HS, Iliopoulos D: MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis. Gastroenterology. 145. pp. 842 (2013).

[87] Lewis A, Felice C, Kumagai T, Lai C, Singh K, Jeffery RR, Feakins R, Giannoulatou E, Armuzzi A, Jawad N, Lindsay JO, Silver A: The miR-200 family is increased in dysplastic lesions in ulcerative colitis patients. PLoS ONE. 12. pp. e0173664 (2017).

[88] McKenna LB, Schug J, Vourekas A, McKenna JB, Bramswig NC, Friedman JR, Kaestner KH: MicroRNAs control intestinal epithelial differentiation, architecture, and barrier function. Gastroenterology. 139. pp. 1654 (2010).

[89] Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, Flake G, Nuovo GJ, Sinar DR, Naziri W, Marcuard SP: Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue. Cancer genomics & proteomics. 6. pp. 281–295 (2009).

[90] Link A, Becker V, Goel A, Wex T, Malfertheiner P: Feasibility of fecal microRNAs as novel biomarkers for pancreatic cancer. PLoS ONE. 7. pp. e42933 (2012).

[91] Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, Goel A: Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 19. pp. 1766–1774 (2010).

[92] Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, Sileri P, Cretella M, Pallone F, Federici G, Bernardini S: Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. Journal of gastroenterology. 46. pp. 1391–1402 (2011).

[93] Wu CW, Ng SSM, Dong YJ, Ng SC, Leung WW, Lee CW, Wong YN, Chan FKL, Yu J, Sung JY: Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps. Gut. 61. pp. 739–745 (2012).

[94] Liu S, da Cunha AP, Rezende RM, Cialic R, Wei Z, Bry L, Comstock LE, Gandhi R, Weiner HL: The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. Cell host & microbe. 19. pp. 32–43 (2016).

[95] Schulz C, Wex T, Arnim Uy, Malfertheiner P: Validation of Two Calprotectin Rapid Tests in Daily Routine. Clinical laboratory. 62. pp. 1249–1254 (2016).

[96] Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ, Kerin MJ, Miller N: Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. BMC molecular biology. 9. pp. 76 (2008).

[97] Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods (San Diego, Calif.). 25. pp. 402–408 (2001).

- [98] Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M: Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer prevention research (Philadelphia, Pa.)*. 5. pp. 492–497 (2012).
- [99] Fisher K, Lin J: MicroRNA in inflammatory bowel disease: Translational research and clinical implication. *World journal of gastroenterology*. 21. pp. 12274–12282 (2015).
- [100] Takagi T, Naito Y, Mizushima K, Hirata I, Yagi N, Tomatsuri N, Ando T, Oyamada Y, Isozaki Y, Hongo H, Uchiyama K, Handa O, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T: Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 25 Suppl 1. pp. 33 (2010).
- [101] Zahm AM, Thayu M, Hand NJ, Horner A, Leonard MB, Friedman JR: Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 53. pp. 26–33 (2011).
- [102] Krichevsky AM, Gabriely G: miR-21: a small multi-faceted RNA. *Journal of cellular and molecular medicine*. 13. pp. 39–53 (2009).
- [103] Shi C, Liang Y, Yang J, Xia Y, Chen H, Han H, Yang Y, Wu W, Gao R, Qin H: MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal colitis through protecting against inflammation and tissue injury. *PLoS ONE*. 8. pp. e66814 (2013).
- [104] Wu H, Neilson JR, Kumar P, Manocha M, Shankar P, Sharp PA, Manjunath N: miRNA profiling of naïve, effector and memory CD8 T cells. *PLoS ONE*. 2. pp. e1020 (2007).
- [105] Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y: miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 26. pp. 2799–2803 (2007).
- [106] Yang Y, Ma Y, Shi C, Chen H, Zhang H, Chen N, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang J, Zhu Q, Liang Y, Wu W, Gao R, Yang Z, Zou Y, Qin H: Overexpression of miR-21 in patients with ulcerative colitis impairs intestinal epithelial barrier function through targeting the Rho GTPase RhoB. *Biochemical and biophysical research communications*. 434. pp. 746–752 (2013).
- [107] Oertli M, Engler DB, Kohler E, Koch M, Meyer TF, Müller A: MicroRNA-155 is essential for the T cell-mediated control of *Helicobacter pylori* infection and for the induction of chronic Gastritis and Colitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 187. pp. 3578–3586 (2011).
- [108] Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD: Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*. 451. pp. 1125–1129 (2008).
- [109] Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, Marchis ML de, Nervi C, Bozzoni I: A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell*. 123. pp. 819–831 (2005).
- [110] Schaefer JS, Montufar-Solis D, Vigneswaran N, Klein JR: Selective upregulation of microRNA expression in peripheral blood leukocytes in IL-10^{-/-} mice precedes expression in the colon. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*. 187. pp. 5834–5841 (2011).
- [111] Wang H, Zhang S, Yu Q, Yang G, Guo J, Li M, Zeng Z, He Y, Chen B, Chen M: Circulating MicroRNA223 is a New Biomarker for Inflammatory Bowel Disease. *Medicine*. 95. pp. e2703 (2016).
- [112] Polytarchou C, Oikonomopoulos A, Mahurkar S, Touroutoglou A, Koukos G, Hommes DW, Iliopoulos D: Assessment of Circulating MicroRNAs for the Diagnosis and Disease Activity Evaluation in Patients with Ulcerative Colitis by Using the Nanostring Technology. *Inflammatory bowel diseases*.

21. pp. 2533–2539 (2015).

- [113] Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, Tuschl T: Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 110. pp. 4255–4260 (2013).
- [114] Duttagupta R, Jiang R, Gollub J, Getts RC, Jones KW: Impact of cellular miRNAs on circulating miRNA biomarker signatures. *PLoS ONE*. 6. pp. e20769 (2011).
- [115] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee M-LT, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*. 3. pp. e3694 (2008).
- [116] Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT: MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*. 13. pp. 423–433 (2011).
- [117] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M: Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108. pp. 5003–5008 (2011).
- [118] Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, Patil M, Sheldon H, Betts G, Homer J, West C, Ragoussis J, Harris AL: The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British journal of cancer*. 104. pp. 1168–1177 (2011).
- [119] Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 9. pp. 654–659 (2007).
- [120] Pigati L, Yaddanapudi SCS, Iyengar R, Kim D-J, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM: Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE*. 5. pp. e13515 (2010).
- [121] McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A: Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clinical chemistry*. 57. pp. 833–840 (2011).
- [122] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M: Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods (San Diego, Calif.)*. 50. pp. 298–301 (2010).
- [123] Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Valley MP, van Zandwijk N, Reid G: Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS ONE*. 6. pp. e24145 (2011).
- [124] Zahm AM, Hand NJ, Tsoucas DM, Le Guen CL, Baldassano RN, Friedman JR: Rectal microRNAs are perturbed in pediatric inflammatory bowel disease of the colon. *Journal of Crohn's & colitis*. 8. pp. 1108–1117 (2014).
- [125] Dalal SR, Kwon JH: The Role of MicroRNA in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology & hepatology*. 6. pp. 714–722 (2010).
- [126] Link A, Balaguer F, Nagasaka T, Boland CR, Goel A: MicroRNA miR-J1-5p as a potential

biomarker for JC virus infection in the gastrointestinal tract. PLoS ONE. 9. pp. e100036 (2014).

[127] Ben-Shachar S, Yanai H, Sherman Horev H, Elad H, Baram L, Issakov O, Tulchinsky H, Pismanik-Chor M, Shomron N, Dotan I: MicroRNAs Expression in the Ileal Pouch of Patients with Ulcerative Colitis Is Robustly Up-Regulated and Correlates with Disease Phenotypes. PLoS ONE. 11. pp. e0159956 (2016).

[128] Lin J, Zhang X, Zhao Z, Welker NC, Li Y, Liu Y, Bronner MP: Novel MicroRNA Signature to Differentiate Ulcerative Colitis from Crohn Disease. A Genome-Wide Study Using Next Generation Sequencing. MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates). 5. pp. 222–229 (2016).

[129] Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N: Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. Critical reviews in oncology/hematology. 80. pp. 193–208 (2011).

[130] Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES: Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. The Journal of molecular diagnostics: JMD. 15. pp. 827–834 (2013).

[131] van Rooij E, Kauppinen S: Development of microRNA therapeutics is coming of age. EMBO molecular medicine. 6. pp. 851–864 (2014).

[132] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Current biology: CB. 12. pp. 735–739 (2002).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt und auf dem Weg bis zur Einreichung des fertigen Manuskriptes begleitet haben.

Allen voran danke ich PD Dr. med. habil. Alexander Link, der mich von Beginn an bei jeglichen Fragen mit Rat und guter Laune betreut hat und trotz seiner Tätigkeit in Klinik, Labor und Forschung immer ein offenes Ohr für mich hatte. Vielen Dank für die Geduld und Hilfsbereitschaft in unseren zahlreichen Gesprächen und E-Mails.

Ich danke Prof. Dr. med. habil. Dr. h. c. Peter Malfertheiner, der mir die Möglichkeit gab, die Promotion in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg durchzuführen und die wissenschaftliche Arbeit stets unterstützt hat.

Ganz besonderen Dank möchte ich dem Team des gastroenterologischen Forschungslabors aussprechen. Für die Einarbeitung ins Labor mit ihrer ausgesprochen freundlichen und hilfsbereiten Art möchte ich mich insbesondere bei Ursula Stolz bedanken. Es hat Spaß gemacht, in einer so netten Atmosphäre im Labor zu arbeiten. Ebenso danken möchte ich Marion Holley, Simone Phillipsen und Cosima Langner, die mir ebenfalls bei jeglichen Fragen zur Laborarbeit hilfsbereit unter die Arme gegriffen haben.

Die Kooperation mit Nha Le ermöglichte die gegenseitige Unterstützung sowie die gemeinsame Probenverarbeitung und Beleuchtung verschiedener Aspekte und Fragestellungen. Auch bei ihr bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich den Schwestern und Ärzten der gastroenterologischen Stationen des Universitätsklinikums Magdeburg für die Unterstützung bei der Probensammlung.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern und Geschwistern, meinem Freund, meiner Tante sowie meinen Freunden, die mich auf meinem Weg begleitet, unterstützt und immer wieder ermutigt haben.

Ohne diese Unterstützung wäre meine Promotion nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„MicroRNA im Blut und im Stuhl als Biomarker für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen“

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. habil. Dr. h. c. Peter Malfertheiner
PD Dr. med. habil. Alexander Link
Nha Le

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Karlsruhe, den 22.03.2018

Katharina Leonie Schönauen

Darstellung des Bildungsweges

„Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.“

„Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.“

Darstellung der bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen

1. Schönauen, Katharina; Le, N.; Arnim, Ulrike von; Schulz, Christian; Malfertheiner, Peter; Link, Alexander

Circulating and fecal microRNAs as Biomarkers for Inflammatory Bowel Diseases

In: Inflammatory Bowel Diseases. Crohn's & Colitis Foundation of America. Wiley-Blackwell publisher's

- Artikel eingereicht, angenommen und im Druck

2. A. Link, K. Schoenauen, N. Le, U. von Arnim, C. Schulz, P. Malfertheiner

P0315 Differential expression of microRNAs in sera and feces of patients with inflammatory bowel disease

- Poster (UEG Week, 24.-28.10.2015, Barcelona, Spanien)

3. Link, Alexander; Schönauen, Katharina; Le, N.; Arnim, Ulrike von; Schulz, Christian; Malfertheiner, Peter

Unterschiedliche Expression von miR-21 und miR-223 in Serum von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

In: Zeitschrift für Gastroenterologie: offizielles Organ: Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten mit Sektion Gastroenterologische Endoskopie; Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie; Ungarische Gesellschaft für Gastroenterologie und Hepatologie. - Stuttgart [u.a.]: Thieme; Bd. 53.2015, Nr. 8, KG029, insges. 1 S.

- Präsentation (70. Jahrestagung der DGVS, 16.-19.9.2015, Leipzig, Deutschland)

Anlage

Anl. 1: miRNA-Expressionsunterschiede (x-fache Änderung)

Serum		miRNA-Expressionsunterschiede (x-fache Änderung)			
		miR-16	miR-21	miR-155	miR-223
Vergleich zur Kontrolle	CED	2,9	2,7	1,5	3,8
	CD	4,5	3,7	1,5	5,8
	UC	0,8	1,6	1,3	1,5
	CED Aktiv	3,1	3,1	1,5	5,4
	CED Remission	2,4	3	1,4	1,9
	CD Aktiv	5,6	4,5	1,9	8,5
	CD Remission	3,4	2,9	0,9	3,2
	UC Aktiv	0,7	0,7	0,6	1
	UC Remission	0,5	2,5	2	2,2
Vergleich	CD/UC	5,7	2,3	1,1	3,8
	CED Aktiv/Remission	1,3	1	1,1	2,9
	CD Aktiv/Remission	1,6	1,5	2,1	2,7
	UC Aktiv/Remission	1,3	3,5	3,2	2,3
Stuhl		miR-16	miR-21	miR-155	miR-223
Vergleich zur Kontrolle	CED	3,5	2,7	2,4	6,5
	CD	3,4	2,4	1,9	5,7
	UC	6,9	5	2,5	10,2
	CED Aktiv	5,5	4,6	2,8	17,1
	CED Remission	1,8	1,2	1,7	2,8
	CD Aktiv	4,1	2,8	2,8	13,1
	CD Remission	1,6	1	1,5	3,7
	UC Aktiv	18,1	7,3	3	67,6
	UC Remission	2,6	1,6	2,5	1,7
Vergleich	CD/UC	2,1	2,1	1,3	1,9
	CED Aktiv/Remission	3	3,8	1,6	6,1
	CD Aktiv/Remission	2,6	2,7	1,8	2,4
	UC Aktiv/Remission	7	4,4	1,2	39,1
Einfluss-Analyse		miR-16	miR-21		
Vergleich	25µl/100µl Stuhl	6,6	11,2		
	Stuhl/EDTA-Blut	30573,6	106,9		
	Stuhl/Serum	6,7	8,8		
	-80°C/20°C	6,5			