

DNA-Microarray Analyse bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen: Differentielle Expression von Mucin Genen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen
Fakultät III – Biologie und vorklinische Medizin der
Universität Regensburg**

vorgelegt von

**Christoph Möhle
aus Bodenwöhr**

2006

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juli 2001 bis Februar 2006 am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität Regensburg unter der Anleitung von Prof. Dr. Gerd Schmitz und PD Dr. Thomas Langmann.

Promotionsgesuch eingereicht am: 08.02.2006

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Rosemarie Baumann

1. Gutachter: Prof. Stephan Schneuwly

2. Gutachter: Prof. Gerd Schmitz

3. Gutachter: Prof. Inga Neumann

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerd Schmitz für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit an seinem Institut und für seine großzügige wissenschaftliche Unterstützung und sein Mentorat.

Herrn Prof. Dr. Schneuwly danke ich für die Bereitschaft die fakultätsinterne Betreuung zu übernehmen.

Meinem Betreuer PD Dr. Thomas Langmann gilt ebenfalls besonderer Dank. Durch seine Anleitung, Motivation und ständige konstruktive Diskussionsbereitschaft, auch nach Dienstschluss, hat er wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Vielen Dank an Dr. Nikolaus Ackermann für seine Hilfe bei der Durchführung der Experimente und für die fachlichen Diskussionen sowie Alexander Kel von der BIOBASE GmbH in Wolfenbüttel für seine Analysen mit der Biobase Software.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Richard Mauerer der mir die medizinischen Aspekte der Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen nahe brachte und mir bei der Einleitung half.

Meinen Laborkollegen Bettina, Conny, Manfred, Wolfgang und Harry danke ich ebenso wie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhls für die angenehme Atmosphäre, die erhaltene Unterstützung und die stets gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich ausdrücklich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Personen bedanken, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der meiste Dank gebührt meinen Eltern und meinem Bruder, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir immer – auch in schwierigen Zeiten – mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Aufbau, Funktion und Erhaltung des intestinalen Epithels	7
1.2	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen.....	16
1.3	Aufbau und Funktion von Mukus und Mucinen	21
1.4	Die Rolle des Mukus und der Mucine bei CED	23
2	Zielsetzung.....	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Materialien und Geräte	26
3.1.1	Geräte.....	26
3.1.2	Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel.....	27
3.1.3	Chemikalien	27
3.1.4	Synthetische Oligonukleotide	27
3.1.5	Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits.....	28
3.1.6	Biologische Materialien.....	29
3.2	Methoden.....	30
3.2.1	Zellkultur	30
3.2.2	Isolierung von RNA.....	31
3.2.3	Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von RNA	31
3.2.4	Reverse Transkription (RT)	33
3.2.5	TaqMan Real-Time RT-PCR	33
3.2.6	DNA Isolierung aus EDTA-Blut.....	37
3.2.7	DNA-Microarray Analyse	38
3.2.8	Statistische Datenauswertung	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Globale mRNA Expressionsprofile von CED-Patienten im	
	Vergleich zu Kontrollprobanden.....	41
4.2	Biostatistische Auswertung der DNA-Microarray Ergebnisse	43

4.3	Pathway bezogene Auswertung der DNA-Microarray Ergebnisse.....	44
4.4	Verminderte Mucinexpression im Ileum und Colon bei CED	49
4.5	Gewebespezifische mRNA Expression der Mucin Gene	50
4.6	Verifizierung der differentiellen Mucin Expression in CED	51
4.7	Promotoranalyse und transkriptionelle Regulation der Mucin Gene ..	54
4.8	Effekt von NF κ B Induktoren und Inhibitoren auf die Mucin	
	Expression in intestinalen Zelllinien	58
4.9	DNA-Mutationsanalyse von Mucin Genen und NOD2 in	
	CED-Kollektiven und gesunden Blutspendern	63
4.10	Expressionsanalyse von Genen in CED Kandidatenloci.....	66
5	Diskussion.....	76
5.1	Vergleichendes Expressionsmonitoring bei CED.....	76
5.2	Transkriptionelle Regulationsmechanismen bei Mucin Genen	80
5.3	Allelische Diskriminierung von Mucin Polymorphismen	83
6	Zusammenfassung	88
7	Literaturverzeichnis	90
8	Eigene Publikationen	100
9	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	102
9.1	Abbildungen.....	102
9.2	Tabellen	103
10	Abkürzungsverzeichnis.....	104
11	Eidesstattliche Erklärung	105

1 Einleitung

1.1 Aufbau, Funktion und Erhaltung des intestinalen Epithels

Der Darm ist Teil des Verdauungstraktes und besteht - grob unterteilt - aus Dünndarm (Ileum), Dickdarm (Colon) und Mastdarm (Rektum). Der mit über 5 Metern längste Teil des Darms ist der Dünndarm. Zu seinen Abschnitten gehört der Zwölffingerdarm (Duodenum), der Leerdarm (Jejunum) und zuletzt der Krummdarm (Ileum). Im Dünndarm wird die Nahrung verdaut und aufgenommen. Deshalb wird seine absorptive Epithelzelloberfläche durch zahlreiche luminale Aus- (Villi) und Einstülpungen in die Submukosa (Krypten) stark vergrößert. Das Ende des Ileums liegt im rechten Unterbauch, wo der Dünndarm in den Dickdarm mündet. Der Dickdarm ist rund 1,5 Meter lang und wird in einen aufsteigenden Teil (Colon ascendens), einen horizontalen Querdarm (Colon transversum) und einen absteigenden Teil (Colon descendens) unterteilt. Er besitzt eine flache, mit Krypten durchsetzte Epithelzelloberfläche ohne Villi. Seine Hauptaufgabe ist die Absorption von Wasser und Salzen. Mit dem Mastdarm oder Enddarm endet der Darm und bildet über dem After (Anus) die Verbindung nach außen [1].

Der grundlegende histologische Aufbau des Intestinaltrakts ist in allen Abschnitten gleich. Die Darmschleimhaut (Mukosa) ist die innerste Schicht der Darmwand. Sie unterteilt sich wiederum in mehrere, sehr dünnen Schichten, u.a. einer dünnen Schleimhautmuskelschicht. Unter der Schleimhaut folgt eine Bindegewebsschicht, die Submukosa, in der feinste Blutgefäße, Lymphbahnen und Neurone enden. In der Muskelschicht (Muskularis) der Darmwand sind glatte Muskelfasern quer und längs verlaufend angeordnet. Durch dessen Innervation entsteht die Peristaltik, durch die der Nahrungsbrei weiter transportiert wird. Die äußerste Schicht der Darmwand wird Serosa oder Adventitia genannt und besteht aus dünnem Bindegewebe. In einigen Darmabschnitten wird die Serosa vom Bauchfell (Peritoneum) gebildet [1].

Die absorptive Schicht der Mukosa besteht aus einer einlagigen Schicht Epithelzellen, in der vier verschiedene Zelltypen vorkommen. Die Enterozyten machen mit bis zu 80% den Hauptbestandteil der epithelialen Zellen im Darm aus. Sie sind säulenförmige Zellen mit apikalen Mikrovilli und bilden mit benachbarten Zellen laterale Zell-Zell-Verbindungen. Durch ihre hydrolytischen und absorptiven Eigenschaften wird die Nahrung verdaut und aufgenommen. Rund 5% der Zellen im Darm sind Becherzellen. Sie verteilen sich auf die Region von der Mitte der Krypten bis zur Spitze des Villus. Gekennzeichnet sind sie durch spezifische Mukus Granula im Zytoplasma, aus denen die apikale Mukus Schicht gebildet wird. Enteroendokrine Zellen machen nur einen kleinen Anteil der Zellen im Darm aus. Sie produzieren zahlreiche, an der Regulation der Darm-Motilität beteiligten Hormone wie Serotonin, Substanz P und Sekretin. Abweichend von den drei bisher beschriebenen intestinalen Zelltypen findet man die wesentlich langlebigeren Paneth Zellen nur am Grund der Krypten. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Schutzfunktion für den Darm, indem sie antimikrobielle Peptide und Enzyme wie Kryptidine, Defensine und Lysozyme aus apikalen zytoplasmatischen Granula sezernieren [2].

Alle vier Zelltypen stammen von Stammzellen am Grund der Krypten ab und haben nur eine kurze Lebensdauer bevor sie ersetzt werden. In jeder Krypten befinden sich schätzungsweise vier bis sechs Stammzellen, die aufgrund eines umfangreichen Nukleus sowie kleinen Zytoplasmas morphologisch identifiziert werden können. Sie zeigen eine starke Proliferationsrate und produzieren undifferenzierte Vorläuferzellen, die zu Enterozyten, enteroendokrinen Zellen, Paneth-Zellen und Becherzellen differenzieren können. Während der fortschreitenden Differenzierung wandern die Zellen, mit Ausnahme der Paneth Zellen, welche immer am Grund der Krypten verbleiben, nach oben in Richtung der Villi. Sobald sie die Krypten-Villi Grenze erreicht haben, sind sie ausdifferenziert. Da durch die Stammzellen ständig neue Zellen gebildet werden, muss das Gleichgewicht der epithelialen Zellen im Intestinum aufrecht erhalten werden. Die Bildung neuer Zellen wird durch Apoptose und Ablösung von Zellen an der Spitze der Villi im Ileum bzw. auf der Epithelzelloberfläche im Colon kompensiert. Dabei befindet sich die gesamte Epithelzellschicht in einer

kontinuierlichen Bewegung nach luminal, die rund fünf Tage beträgt. Nur Paneth Zellen, mit einer Lebensdauer von ca. 20 Tagen und die immortalen Stammzellen sind davon ausgenommen. Weiterhin ist die Proferation im Intestinum keine Eigenschaft der Zellen selbst, sondern wird durch die Krypten bestimmt. Dadurch können während der Zellwanderung entlang der Krypten-Villus Achse proliferative und differentielle Kompartimente aufrecht erhalten werden [2][3].

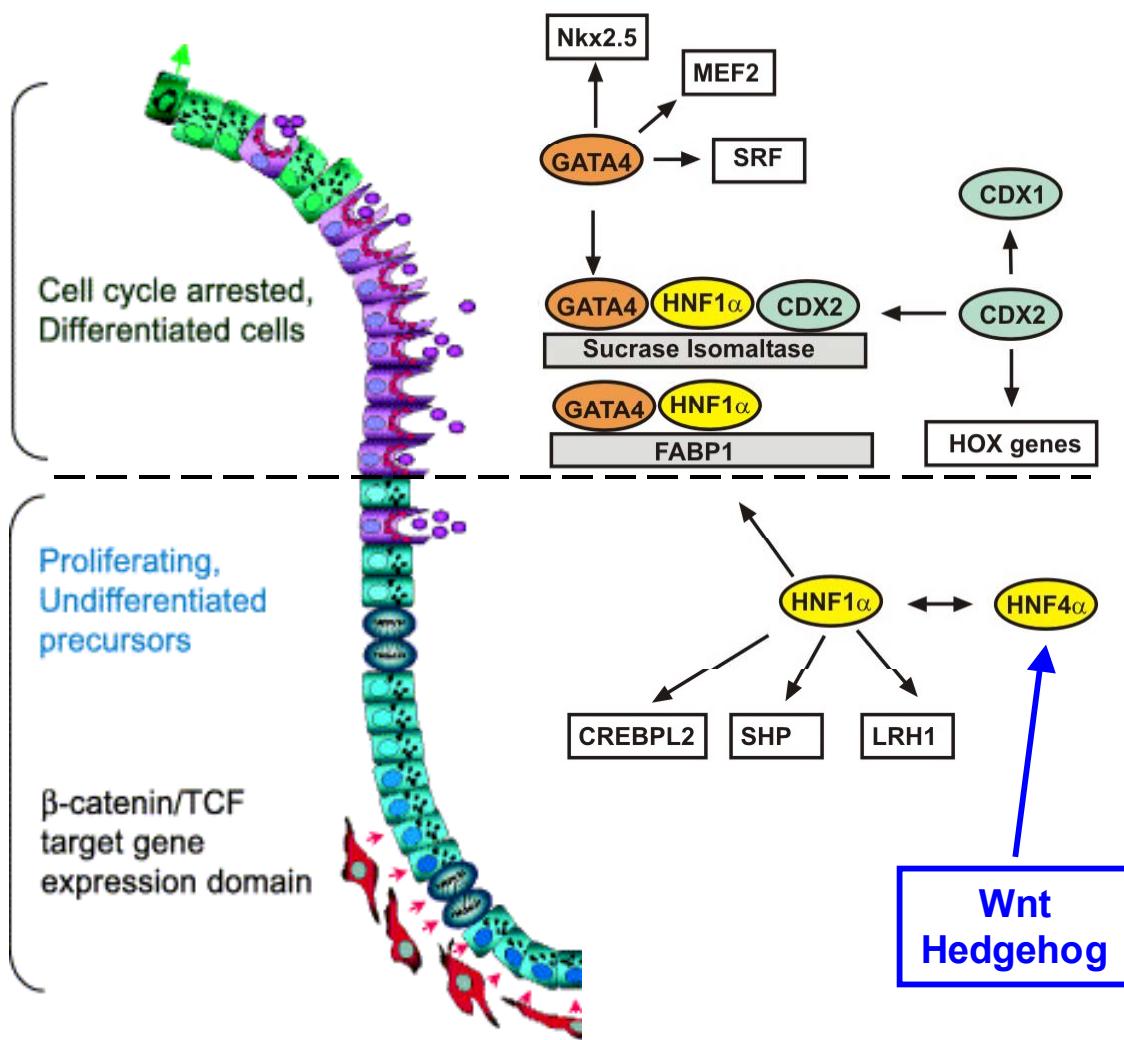


Abb. 1 Differenzierung und Erhaltung des intestinalen Epithels mit den daran beteiligten Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren. Stammzellen im unteren Teil der Krypten produzieren stark proliferierende Vorläuferzellen, die differenzieren und in Richtung Villi (Enterozyten, enteroendokrine Zellen und Becherzellen) bzw. auf den Grund der Krypten (Paneth-Zellen) wandern. β -catenin/TCF und hedgehog Gene werden im proliferativen Bereich exprimiert und aktivieren als Zielgene Transkriptionsfaktoren der frühen intestinalen Differenzierung (CDX-, GATA-, HNF Gene), die entweder alleine oder in einem komplexen Zusammenspiel die Transkription weiterer Zielgene bewirken.

Der molekulare Prozess der ständigen Zellerneuerung und der Homöostase des intestinalen Epithels wird durch ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren gesteuert (Abb. 1). Bisher am besten verstanden dabei sind die Beteiligungen der wingless/β-Catenin, TGFβ/BMP, notch, und hedgehog Signalkaskaden sowie der Transkriptionsfaktoren HNF1 α , CDX2 und GATA4. Nahezu alle von ihnen spielen zusätzlich in der embryonalen Darmentwicklung bereits eine bedeutende Rolle [2][3][4].

Das zytoplasmatische Protein β-catenin stellt das zentrales Molekül der wingless Signalkaskade dar. In epithelialen Zellen liegt β-catenin entweder als stabiler Komplex gebunden an die intrazelluläre Domäne von E-cadherin oder frei im Zytoplasma vor. Das freie β-catenin wird durch die Kinasen im APC Komplex in einem hochkonservierten Bereich am N-terminalen Ende, der zahlreiche Serin und Threonin Reste enthält, phosphoryliert. Der APC Multienzymkomplex besteht unter anderem aus den Proteinen *glycogen synthase kinase 3*, *casein kinase 1*, *axin 2* und *adenomatous polyposis coli protein*. Nach der Phosphorylierung wird β-Catenin ubiquitiniert und rasch im Proteasom degradiert. Bei den wingless Rezeptoren handelt es sich um die 10 humane Gene umfassende Familie der *frizzled* Transmembranproteine und den zwei Mitgliedern der LDL Rezeptor Familie LRP5 und LRP6. Bindet wingless (bisher sind 20 humane wingless Gene bekannt) an ein Rezeptordimer aus *frizzled* und LRP, wird das zytoplasmatische Protein *dishevelled* zusammen mit dem *axin* Protein aus dem APC Komplex an die Plasmamembran rekrutiert. Der APC Komplex zerfällt und verliert seine intrinsische Kinaseaktivität, wodurch β-catenin nicht länger abgebaut wird und in den Kern translozieren kann. Dort bindet β-catenin an DNA-Bindeproteine der *T cell factor/lymphoid enhancing factor* (TCF/LEF) Familie und dieser Komplex aktiviert die Transkription von wingless Zielgenen (siehe auch Abb. 1) [5][6][7].

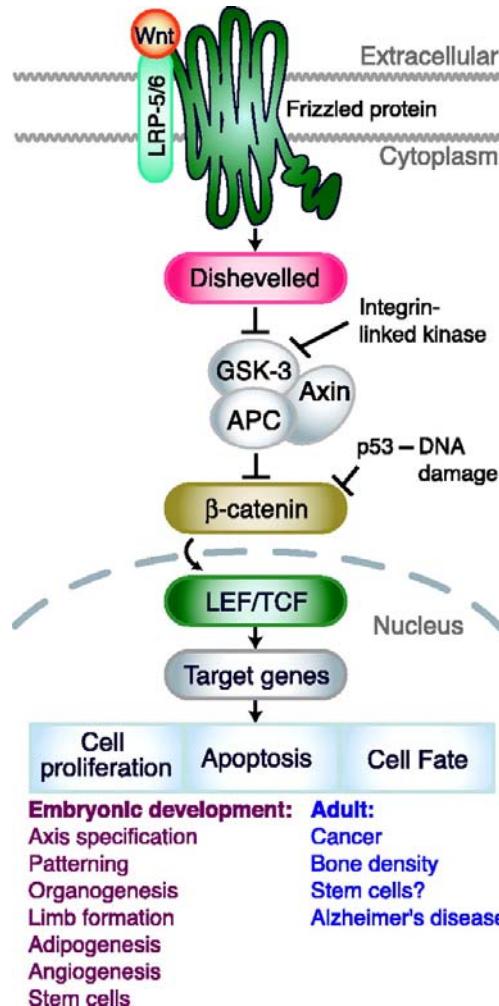


Abb. 2 Darstellung der Schlüsselmoleküle der wingless/β-catenin Signalkaskade. Die Bindung des wingless Liganden an das frizzled/LRP Rezeptordimer, führt zu einer Phosphorylierung von β-catenin durch den APC Komplex. So aktiviertes β-catenin transloziert in den Kern, bindet an LEF/TCF Proteine und bewirkt die Expression von Zielgenen, die sowohl in der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Stadium eine Vielzahl an zellulären Prozessen auslösen (modifiziert nach [8]).

Es konnte gezeigt werden, dass proliferative Zellen am Grund der Krypten des Dünnd- und Dickdarmes β-catenin akkumulieren. Weiterhin führen Mutationen, die eine Aktivierung der wingless Kaskade zur Folge haben, zu humanen kolorektalen Karzinomen und zu Bildung von adenomatösen Darmpolypen bei Mäusen. Mutationen im TCF4 Gen, des darmspezifischen Mitglieds der TCF/ELC Familie, führen zu einem Verlust der proliferativen Bereiche im Dünndarm. Inhibiert man den β-catenin/TCF4 Signalweg in colorektalen Karzinomzellen, ändert sich ihr Phänotyp von einem Krypten-artigen in einen differenzierten Villusepithel-artigen. Außerdem bewirkt die Überexpression des

löslichen wingless Inhibitors *dickkopf homolog 1* eine stark verminderte epitheliale Proliferation, die mit dem Verlust der Krypten einhergeht [5][9][10][11][12]. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, dass die wingless Signalkaskade unbedingt zur Steuerung und Aufrechterhaltung der Stammzell- und Progenitor Kompartimente in den Krypten notwendig ist. Somit trägt sie maßgeblich zur Homöostase des intestinalen Epithels bei.

Die TGF β Familie reguliert in ihrer Funktion als Wachstumsfaktoren eine Vielzahl an biologischen Prozessen während der Embryogenese, der Organogenese und der Wundheilung. Als Liganden dieser Kaskade agieren Zytokine, die in TGF β Proteine, *bone morphogenetic proteins* (BMPs) und die *Aktivine* unterteilt werden. Nach Ligandbindung dimerisieren zwei Oberflächenrezeptoren, wobei der Typ1 Rezeptor vom Typ2 Rezeptor phosphoryliert und somit aktiviert wird. Intrazellulär wird das Signal dann durch *mothers against decapentaplegic homolog* (SMAD) Mediatorproteine weitergeleitet. Man unterscheidet drei verschiedene Typen von SMADs: Rezeptor regulierte (SMAD1, -2, -3, -5 und -8), allgemeine (SMAD4) und inhibitorische (SMAD6 und -7). Rezeptor regulierte SMADs werden durch die aktivierte Typ I Rezeptoren phosphoryliert, assoziieren mit SMAD4 und translozieren anschließend in den Kern. Dort interagiert der SMAD Komplex mit Koaktivatoren bzw. Korepressoren und reguliert damit die Transkription von Zielgenen. Durch TGF β Liganden ausgelöste Signale werden hauptsächlich durch SMAD2 und -3 weitergeleitet, wohingegen SMAD1, -5 und -8 spezifische BMP Signalmediatoren darstellen [13][14]. Wird durch Mutationen in Mitgliedern der TGF β Familie das Signal unterbrochen, kommt es zu verschiedenen hyperproliferativen Prozessen im Darm. Die häufigsten Mutationen inaktivieren den TGF β Rezeptor Typ II und führen zu mikrosatellitenstabilen oder mikrosatelliteninstabilen Tumoren [15], bzw. betreffen SMAD2 und SMAD4, was kolorektale Karzinome auslöst [16]. Mutationen im BMP Signalweg (hauptsächlich BMP Rezeptor Typ I und SMAD4) sind mit der präcancerogenen Familiären Juvenilen Polyposis assoziiert [17][18]. Diese Ergebnisse lassen

eine Beteiligung der TGF β /BMP Signalkaskade an der intestinalen Epithelzelldifferenzierung und Homöostase vermuten.

Bei der notch Signalkaskade handelt es sich um ein in zahlreichen Prozessen beteiligtes System zur räumlichen Musterbildung und zur Auslösung der Zelldifferenzierung [19]. Notch Gene (NOTCH1, -2, -3 und -4) kodieren monomere Transmembran-Rezeptoren. Ihre Liganden (DELTA-like1, -3 und -4, sowie JAGGED1 und -2) stellen ebenfalls Transmembran-Moleküle dar. Erfolgt eine Bindung von Rezeptor mit dem Ligand der Nachbarzelle, kommt es zu einer proteolytische Spaltung des Rezeptors und zur Translokation der notch intrazellulären Domäne (NICD) in den Kern. Dort bindet NICD an den Transkriptionsrepressor *recombining binding protein suppressor of hairless* (RBPSUH), aktiviert diesen und bewirkt so die Transkription von notch Zielgenen. Die notch Kaskade wird nur ausgelöst, wenn über die normale Aktivierung durch die Nachbarzellen hinaus verstärkt Liganden an die Rezeptoren binden. Dieses geschieht durch, im Detail noch unverstandene, stochastische Ereignisse und/oder extrinsische bzw. intrinsische Mechanismen, die jedoch durch eine positive feedback Regulation schnell verstärkt werden. Unter den notch Zielgenen befindet sich die Familie der *hairy/enhancer of split* (HES) Repressoren, bei denen es sich um basic helix-loop-helix Proteine handelt und die wiederum nachgeschaltete Zielgene regulieren [20][21]. Im Darm kommt es zu einer ständigen Erneuerung der vier epithelialen Zelltypen durch gemeinsame Stammzellen auf dem Grund der Krypten. Deshalb muss der, durch wingless/ β -catenin gesteuerte, Wechsel von Proliferation zu Differenzierung zeitlich und räumlich mit Mechanismen überlappen, die das Differenzierungsschicksal der einzelnen Zellen bestimmen. Dabei bestimmt die notch-HES1 Kaskade, ob die Differenzierung in die absorptive oder sekretorische Richtung verläuft. HES1 defiziente Tiere zeigen eine erhöhte Zahl an Mukus sezernierenden und enteroendokrinen Zellen bei gleichzeitig weniger absorptiven Zellen. Ein Zielgen von HES1 ist der basic helix-loop-helix-Transkriptionsrepressor MATH1, dessen Expression in proliferativen Zellen im Dünndarm nachgewiesen wurde. MATH1 $^{-/-}$ Mäusen fehlen Becherzellen, Paneth-Zellen und enteroendokrine Zellen. Zellen die MATH1 nicht exprimieren

bleiben im Progenitor Pool und differenzieren ausschließlich zu Enterozyten, während MATH1 in einem frühen Stadium die Differenzierung in Richtung Becherzellen, Paneth-Zellen und enteroendokrine Zellen dirigiert [22].

Bei der hedgehog Signalkaskade wirken die sezernierten Proteine *sonic hedgehog* (SHH), *indian hedgehog* (IHH) und *desert hedgehog* (DHH) als Liganden für die Transmembran-Proteine *smoothened* (SMO), *patched* (PTCH) und *hedgehog-interacting protein* (HIP). In Abwesenheit der Liganden inhibiert PTCH die Aktivität von SMO. Nach Bindung eines hedgehog Liganden an den PTCH Rezeptor kommt es zur Aufhebung der SMO Blockade, was eine Signalkaskade in Gang setzt, die schließlich zur Translokation von Zink-Finger Transkriptionsfaktoren der *GLI-Kruppel family member* Familie (GLI1, GLI2 und GLI3) aus dem Zytoplasma in den Kern und zur Expression von hedgehog Zielgenen führt. Bereits während der intestinalen Entwicklung steuern hedgehog Liganden als Morphogene konzentrationsabhängig das spätere Differenzierungsschicksal der Zellen. SHH und IHH werden bereits in frühen Entwicklungsstadien vom entodermalen Epithel in unterschiedlichen Mustern exprimiert und definieren so die vier Symmetriearchsen bei der Darmrohrdifferenzierung. Es gibt auch Hinweise auf eine Beteiligung der hedgehog Signalkaskade am Prozess der Erneuerung intestinaler Zellen. IHH und SHH werden von den proliferativen Epithel Vorläufern in den Krypten exprimiert. IHH defiziente Mäuse besitzen im Dünndarm kürzere Villi und eine verringerte Zahl an epithelialen Vorläuferzellen. Außerdem ist die Kryptenausbildung im Dickdarm bei diesen Tieren gestört [23][24]. SHH^{-/-} Mäuse, wie auch verschiedene Mutationen in GLI Genen führen zu einer Bandbreite an anorektalen Missbildungen, wie Malrotation, Anus imperforatus und Cloaca persistens [23][25].

Die Familie der humanen *caudal type homeobox* Transkriptionsfaktoren umfasst die Gene CDX1, CDX2 und CDX3. Dabei handelt es sich um sogenannte Para-Homeobox Gene, welche die Musterbildung von Organen und Geweben steuern sowie die Identität von Körpersegmenten festlegen. Sie sind an der embryonalen Entwicklung des Darmes und im adulten Intestinum an der Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Differenzierung und

Zellerneuerung beteiligt [26]. Exprimiert wird CDX1 hauptsächlich in Zellen in den Krypten, wohingegen CDX2 überwiegend in Zellen in den Villi transkribiert wird. Beide Transkriptionsfaktoren sind Zielgene der wingless Kaskade und werden durch diese aktiviert [27]. Eine ektopische Expression von CDX2 unter Kontrolle eines magenspezifischen Promotors führte in Mäusen 37 Tage nach der Geburt zur vollständigen Konversion der Magenmukosa in Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Enterozyten. Diese darmepithelspezifischen Zellen kommen im Magen normalerweise nicht vor, ebenso wird CDX2 gastrisch nicht exprimiert [28][29]. Weiterhin fungiert CDX2 als Tumor Suppressor Gen, da $CDX2^{+/-}$ heterozygote Mäuse nach niedrig dosierter Azoxymethan Gabe im distalen Colon Adenokarzinome entwickelten [30].

Alle sechs humanen Vertreter der *GATA binding proteins* (GATA1 bis -6) besitzen eine konservierte Zink-Finger DNA-Bindedomäne und binden als Monomer an die DNA Sequenz WGATAR. GATA4, -5 und -6 werden im Darm exprimiert, aktivieren dort die Expression zahlreicher Zielgene und steuern so die intestinale Zelldifferenzierung [31][32].

Bei den *hepatic nuclear factor 1* Transkriptionsfaktoren HNF1A und HNF1B handelt es sich um Homeobox Gene, die eine hoch homologe DNA-Bindedomäne gemeinsam haben, mit der sie als Hetero- oder Homodimere an die selbe Erkennungssequenz binden. Alternativ werden sie auch als *transcription factor 1, hepatic* (TCF1) bzw. *transcription factor 2, hepatic* (TCF2) bezeichnet. Sie fungieren in der Leber und im Darm als entscheidende Regulatoren der Genexpression und der Zelldifferenzierung. Im Mausmodell konnten funktionelle Interaktionen von HNF1A und GATA4, bzw. von HNF1A, GATA4 und CDX2 gezeigt werden, welche die Expression der intestinalen Gene *lactase-phlorizin hydrolase* (LCT) bzw. *sucrase-isomaltase* (SI) modulieren [33][34].

1.2 Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED) fasst man heute die Erkrankungen Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) zusammen. Beide Formen sind durch eine in der Darmwand ablaufende chronische Entzündungsreaktion gekennzeichnet, wobei jedoch die Ätiologie und Pathogenese in weiten Teilen noch schlecht verstanden sind. Dies unterscheidet sie von Darmentzündungen mit bekannten Ursachen, wie z.B. Infektionen. Außerdem zeigen sie einen meist lebenslangen Verlauf, wobei sich akute Krankheitsphasen mit Remissionsphasen abwechseln können. Neben diesen grundlegenden Gemeinsamkeiten gibt es jedoch auch eine Reihe von Unterschieden hinsichtlich klinischer Symptomatik, sowie endoskopischer, histologischer und radiologischer Befunde (Tabelle 1), die erst zusammen genommen die Diagnose MC bzw. CU ergeben [35][36].

Trotz intensiver Forschungen in den letzten Jahrzehnten ist es bis jetzt nicht gelungen, die Ursachen und die Entstehungsmechanismen von CED eindeutig aufzuklären. Verschiedene Nahrungs- und Genussmittel, psychische Faktoren sowie infektiöse Agentien werden als Auslöser diskutiert. Ein Beweis steht noch aus. Allerdings liefern unterschiedlich häufiges Auftreten in verschiedenen ethnischen Gruppen, Häufung bei Familien- und Zwillingsstudien und erkennbare Assoziationen mit anderen genetisch bedingten Erkrankungen eindeutige Hinweise auf einen genetischen Hintergrund dieser Erkrankungen [37][38][39]. Ebenso gilt als sicher, dass Umweltfaktoren eine Rolle spielen müssen, worauf ein Nord-Süd- bzw. Ost-West- Gefälle, sowie ein starker Anstieg der Inzidenz sowohl von MC als auch CU in den westlichen Industriestaaten über die letzten Jahrzehnte hindeuten [40]. Interessant ist auch, dass die Inzidenz bei Emigranten aus Gebieten mit niedrigem Risiko bei Einwanderung in Gebiete mit hoher Erkrankungswahrscheinlichkeit steigt [41][42].

Tabelle 1 Diagnosekriterien für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Klinische Präsentation		
Schmerzen	<ul style="list-style-type: none"> Bauchschmerzen im rechten Unterbauch, kolikartig kann klinisches Bild der akuten Appendizitis imitieren Besserung nach Defäkation oft, schleimig 	<ul style="list-style-type: none"> Tenesmen, krampfartige (eher moderate) Schmerzen, v.a. im linken Unterbauch
Durchfälle		<ul style="list-style-type: none"> fast immer bei alleiniger Proktitis eher Obstipation schleimig-blutig, z.T. Eiterbeimengung
Fisteln	<ul style="list-style-type: none"> Perianalfisteln, periproktitische Abszesse 	<ul style="list-style-type: none"> sehr selten
Allgemeinsymptome	<ul style="list-style-type: none"> Anämie, Fieber >38,5°C 	<ul style="list-style-type: none"> Übelkeit, Erbrechen, Gewichtsverlust
Komplikationen	<ul style="list-style-type: none"> bei Dünndarmbefall: Malassimilation maligne Entartung (seltener als bei CU) 	<ul style="list-style-type: none"> akute Blutung toxisches Megakolon maligne Entartung bei Krankheitsverlauf über 30 J.: 12-20%
Endoskopischer Befund		
Lokalisation	<ul style="list-style-type: none"> Auftreten im gesamten GIT möglich 30-40% nur Dünndarm, 40-55% Dünnd- und Dickdarm, 15-25% nur Dickdarm bei Dünndarmbefall in 90% terminal. Ileum betroffen 	<ul style="list-style-type: none"> auf Kolon beschränkt, Rektum stets betroffen 40-50% Rektum (und Sigma), 30-40% teilweise Kolon, 20% Pankolitis terminal. Ileum in 10-20% im Sinne einer "backwash"-Ileitis betroffen
Befallsmuster	<ul style="list-style-type: none"> diskontinuierlicher, segmentaler Befall ("skip lesions") 	<ul style="list-style-type: none"> kontinuierlich vom Rektum nach proximal
Läsionen	<ul style="list-style-type: none"> aphthöse Ulzerationen, fissurale Ulzerationen, dazwischen ödematös geschwollene Schleimhautinseln ("Pflastersteinrelief") Fisteln 	<ul style="list-style-type: none"> mild: Mukosa gerötet, fein granuliert ("Sandpapier") schwer: Schleimhautödem, Blutungen, Ulzera, Pseudopolypen
Stenosen	<ul style="list-style-type: none"> fibrotischer Umbau der entzündeten Darmwand führt zu Strikturen und Stenosen 	<ul style="list-style-type: none"> nie (bei Vorliegen karzinomverdächtig)
Histologischer Befund		
Ausdehnung des entzündlichen Infiltrats	<ul style="list-style-type: none"> befällt alle Wandschichten (transmural) 	<ul style="list-style-type: none"> auf Mukosa und oberflächliche Submukosa beschränkt
Granulome	<ul style="list-style-type: none"> nicht-verkäsend im Darm, Lymphknoten, Leber, Pankreas typisch, aber nur in 50% der Fälle 	<ul style="list-style-type: none"> nie
Kryptenabszesse	<ul style="list-style-type: none"> selten 	<ul style="list-style-type: none"> häufig Einwanderung Neutrophiler in das Kryptenepithel
weitere Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> knötchenförmige Lymphozytenaggregate in allen Wandschichten incl. Subserosa neurale Hyperplasie 	<ul style="list-style-type: none"> deutliche Atrophie der Mukosa Teleangiektasien
Radiologischer Befund		
Frühstadium	<ul style="list-style-type: none"> aphtoide Läsionen, daneben unauffällige Areale 	<ul style="list-style-type: none"> feine Granulationen, verdickte Mukosa, Spiculae
fortgeschrittenes Stadium	<ul style="list-style-type: none"> tiefe, solitäre, längsverlaufende Ulzerationen, Pflastersteinrelief, Fisteln 	<ul style="list-style-type: none"> grobe Granulierung, (Kragenknopf-) Ulzera, Verlust der Haustrierung
Spätstadium	<ul style="list-style-type: none"> Stenosierung 	<ul style="list-style-type: none"> Schleimhautatrophie, Schrumpfung, starrer Kolonrahmen ("Bleirohr")
Laborbefunde		
pANCA* 2-3% bei Gesunden	<ul style="list-style-type: none"> gelegentlich (5-10%) 	<ul style="list-style-type: none"> häufig (60-70%)
ASCA** ca. 5% bei Gesunden	<ul style="list-style-type: none"> häufig (60-70%) 	<ul style="list-style-type: none"> gelegentlich (10-15%)

* perinukleäre Antineutrophile Zytosplasmaantikörper, ** Anti-*Saccharomyces cerevisiae*-Antikörper (modifiziert nach [35] und [36])

Zusammengefasst ergeben die Ergebnisse dieser zahlreicher Untersuchungen die heute allgemein akzeptierte und in Abb. 3 dargestellte Hypothese. Die chronische Entzündung beruht auf einer abnormalen (pathologischen) Interaktion zwischen Darmepithel und intestinalem Immunsystem einerseits und im Darmlumen vorkommenden normalen (physiologischen) Antigenen andererseits, wobei die Empfänglichkeit hierfür genetisch festgelegt ist. Zusätzlich scheinen zivilisatorische und geographische Lebensumstände einen Einfluss auf die Manifestation von CED zu haben [43].

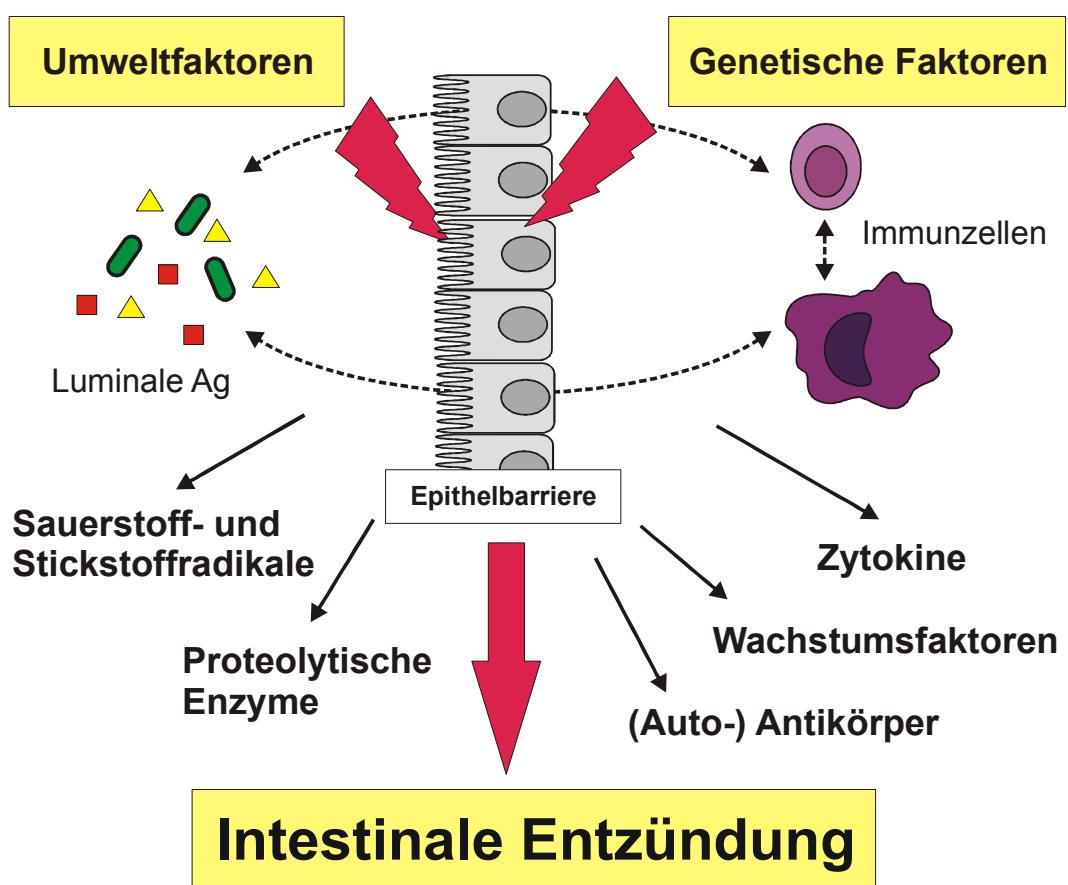


Abb. 3 Modellvorstellung zur Pathogenese Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen. Nach derzeitiger Meinung liegt der Entzündung eine Störung des Zusammenspiels zwischen luminalen Antigenen, Epithelbarriere und Immunzellen zugrunde. Dadurch kommt es zur Überstimulation mit Freisetzung von Radikalen, Antikörpern, Zytokinen etc. durch die beteiligten Zellen. Neben einer genetischen Komponente spielen auch Umwelteinflüsse eine Rolle.

Die Mukosa hat die Aufgabe selektiv zum einen "erwünschte" Bestandteile des Darminhalts wie Nähr- und Mineralstoffe, aber auch intakte Proteine (z.B.

Immunglobuline in der Muttermilch) aufzunehmen, zum anderen aber "unerwünschte" infektiöse oder toxische Bestandteile auszugrenzen. Diese Abwehrfunktion wird von einer mechanischen Barriere aus einer intakten, durch Zell-Zell-Kontakte fest verbundenen Epithelzellschicht mit dazugehörigem Schleimüberzug und durch die immunologische Barriere des Mukosa-assoziierten Immunsystems des Darms, engl. GALT (*gut associated lymphoid tissue*) gewährleistet. Dabei nimmt auch das Epithel selbst immunologische Funktionen wie Antigenpräsentation oder Zytokinproduktion wahr. Das GALT ist funktionell eigenständig und weist einige Unterschiede zum Immunsystem des peripheren Blutes auf. So ist z.B. das Verhältnis zwischen B- und T-Lymphozyten in der Lamina propria der Mukosa deutlich zugunsten der B-Zellen verschoben. Auch befindet sich das intestinale Immunsystem im Gegensatz zum systemischen Immunsystem in einem physiologischen Aktivierungszustand. Dies kann man zum einen durch Aktivierungsmarker auf den Immunzellen, zum anderen durch die Fähigkeit der Lymphozyten *in vitro* spontan, d.h. ohne weitere Stimulation Immunglobuline freizusetzen, erkennen. Diese von den B-Zellen sezernierten Immunglobuline gehören im Darm v.a. zur Klasse IgA. Diese Ig-Klasse kann anders als IgG, das Hauptimmunglobulin des peripheren Blutes, kaum Komplement aktivieren. IgA erreicht also die Eliminierung eines Antigens nicht durch das Auslösen einer Entzündungsreaktion, sondern durch Komplexierung und Inaktivierung und damit auch ohne Schädigung des Darmepithels. Im pathologischen Zustand wie im Fall der CED ändert sich das Immunglobulinprofil. Es kommt zu einem Anstieg aller Klassen, besonders stark jedoch der IgG, der Fraktion mit dem höchsten pathogenen Potential [44].

Der permanente geringgradige Entzündungszustand der intestinalen Mukosa, welcher in der kontinuierlichen Stimulation von Immun- und Epithelzellen begründet ist, unterliegt im physiologischen Zustand einer strengen Kontrolle, um eine überschießende Entzündung und damit Gewebsschädigung zu verhindern. Diese Regulation kommt unter anderem durch ein Gleichgewicht pro- und antiinflammatorischer Zytokine zustande und dieses Gleichgewicht scheint bei CED zugunsten der entzündungsfördernden Zytokine verschoben

zu sein. Besonders interessant sind die von T-Lymphozyten produzierten Zytokine, da in der Darmwand von CED Patienten im Vergleich zu Gesunden ein stark erhöhter Anteil CD4+ T-Helferzellen gefunden wird. Diese Zellen werden aufgrund ihres unterschiedlichen Zytokinsekretionsmusters in die zwei Untergruppen Th1 und Th2 eingeteilt. Dabei scheinen bei Morbus Crohn T-Helferzellen von Typ 1 (Th1) und damit die Produktion von Mediatoren wie IFN γ und IL2 vorzuherrschen, bei Colitis ulcerosa atypische Th2-Zellen, die TGF β und IL5, aber kein IL4 freisetzen. Somit führt bei CED eine intrinsische Störung des Immunsystems, ausgelöst durch überschießende Aktivierung oder mangelnde Gegenregulierung, zu einer permanenten Überstimulation und deshalb zu einer schädigenden Immunreaktion [36].

Neben diesen immunologischen Aufgaben erfüllt das intestinale Epithel weitere Aufgaben. So trägt sein aktiver Entgiftungsmechanismus zum Schutz des Organismus vor schädlichen Substanzen bei. Analog zur Detoxifikationsfunktion der Leber, gliedert sich dieser Mechanismus in drei Phasen: 1. Einführung einer reaktiven Gruppe z.B. durch Redox- oder Hydroxylierungsreaktionen, 2. Kopplung von Sulfaten, Glucuronaten, Acetylaten usw. an diese Gruppen, um ein hydrophileres und damit leichter ausscheidbares Molekül zu erhalten und 3. Ausschleusung dieser Moleküle über spezialisierte Transporter aus der Zelle. Unsere Arbeitgruppe konnte bereits einen Verlust der Detoxifikation im Colon von Colitis ulcerosa Patienten aufgrund einer verminderten Expression von Genen aller drei Phasen zeigen [45].

Von großer Bedeutung ist auch die Funktion des Darmepithels als eine intestinale Barriere. Durch die Ausbildung von undurchlässigen Zell-Zell-Kontakten wird der Darminhalt physikalisch im Darmlumen zurückgehalten. Darüber hinaus sezerniert die Epithelzellschicht eine Mukus genannte Schutzschicht aus Schleim, die einen direkten Kontakt mit luminalen Agentien verhindert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Integrität dieser Barriere bei CED gestört und die Permeabilität erhöht ist. So konnten verschiedene Arbeitsgruppen eine differentielle Regulation von Zelladhäsionsgenen, wie *tight junctions* oder Desmosomen zeigen [46][47]. Weiterhin wurden bei CED Veränderungen des Mukus beschrieben, welche insbesondere auf Expressions-

änderungen von Mucinen, den strukturbildenden Proteinen, zurückzuführen sind. Deshalb sollen der Mukus und die Mucine im Folgenden näher beschrieben und auf deren Rolle bei CED im Detail eingegangen werden.

1.3 Aufbau und Funktion von Mukus und Mucinen

Das Darmepithel ist im physiologischen Zustand apikal vom Mukus, einer Schutzschicht aus Schleim, überzogen. Dieser hat zum einen die Aufgabe den Darminhalt zu befeuchten, um die Darmpassage zu erleichtern. Zum anderen dient er als zusätzliche physikalische Barriere vor dem Epithel. Die Dicke der Schicht variiert in den unterschiedlichen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes, wobei sie in den Bereichen mit der stärksten physikalischen bzw. chemischen Beanspruchung am umfangreichsten ist. So beträgt die Dicke auf der Magenschleimhaut, die dem sauren Mageninhalt ausgesetzt ist, bis zu 450µm. Der gesamte Dünndarm ist von einer deutlich dünneren und diskontinuierlichen Schicht ausgekleidet, wohingegen im Colon mit seiner mikrobiellen Besiedelung die Dicke abschnittsweise wieder zunimmt und im Rektum eine Dicke von nahezu 300µm erreicht [48]. Sowohl auf der luminalen Seite als auch auf der Epitheloberfläche wird der Mukus von jeweils einer Schicht aus Phosphatidylcholin (PC) und Lysophosphatidylcholin (PC) begrenzt, welche einen zusätzlichen physikalischen Schutz vermitteln [49]. Insgesamt besteht der Mukus zu mehr als 90 Prozent aus Wasser mit darin eingelagerten anorganischen Salzen, Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen. Hauptbestandteil der organischen Moleküle sind die Mucine, eine Familie von sehr großen (1 bis 20×10^6 Dalton), filamentösen Glykoproteinen, die auch für den gelartigen Charakter der Schleimschicht verantwortlich sind.

Mittlerweile wurden 21 Mitglieder der humanen Mucin Genfamilie identifiziert, die in der zeitlichen Reihenfolge ihrer Entdeckung mit MUC1 bis MU20 bezeichnet werden [50][51][52][53][54]. Die Mucin Proteine werden in zwei Hauptgruppen eingeteilt. Zum einen die membranständigen Mucine (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC17, MUC20), welche von den Epithelzellen produziert werden. Sie sind Bestandteil der

Glykokalix auf der apikalen Membran des Epithels und außerdem an der intrazellulären Signalweiterleitung beteiligt. Zum anderen die sezernierten Mucine (MUC2, MUC5A, MUC5B, MUC6, MUC15), die hauptsächlich von gastrointestinale Becherzellen produziert werden und die Schleimschicht über der Epitheloberfläche bilden. Als bisher einziger Vertreter der löslichen Mucine gilt MUC7, ein antibakterielles Agens im Speichel [55].

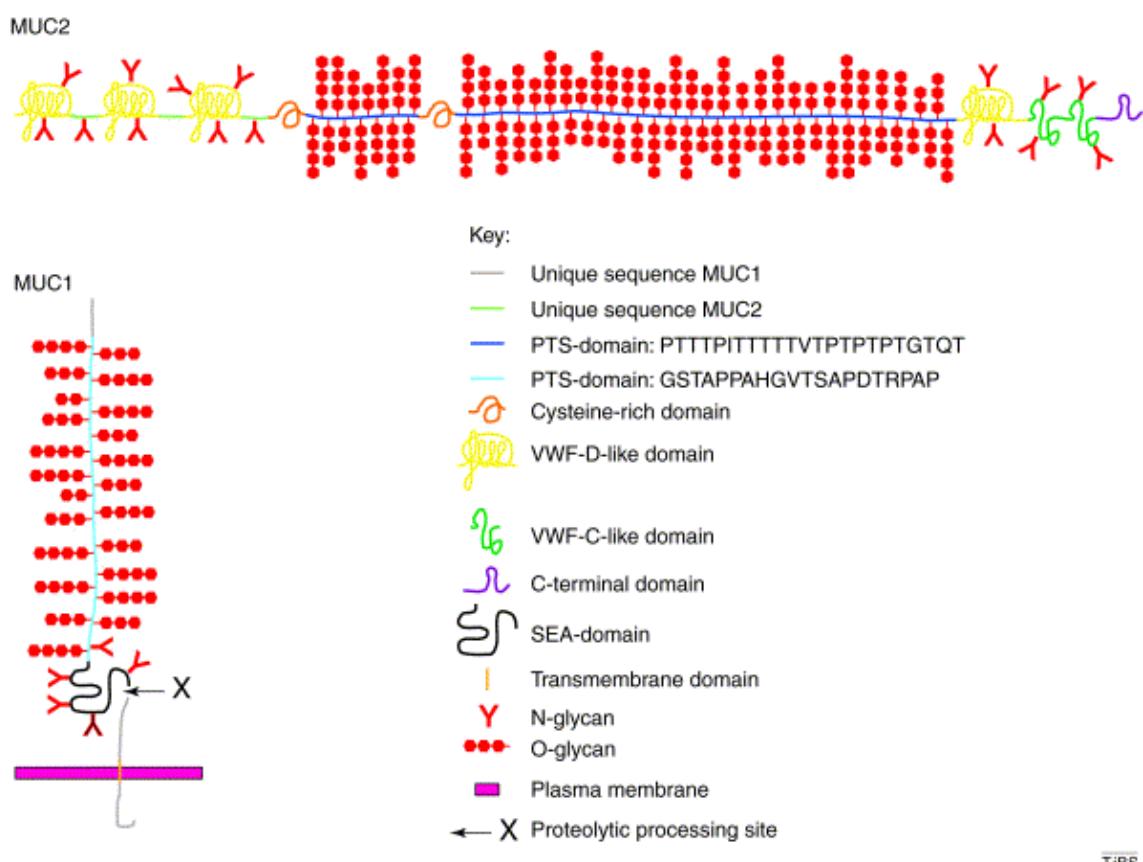


Abb. 4 Allgemeiner struktureller Aufbau von Mucin Proteinen am Beispiel je eines Vertreters aus der Gruppe der membranständigen (MUC1) und der sezernierten (MUC2) Mucine. Dabei werden der gleiche grundlegende filamentöse Aufbau und starke Unterschiede in der Feinstruktur der beiden Gruppen deutlich, was durch gleiche bzw. unterschiedliche Farben angedeutet ist [50].

Allen gemein ist ein filamentöser Aufbau mit einer linearen Polypeptidkette als Proteinkern (Abb. 4). Diese enthält hochrepetitive Prolin, Threonin, Serin (PTS) reiche Abschnitte, die für eine umfangreiche posttranskriptionale O-Glykosylierung verantwortlich sind. Die dabei angehängten 2 bis 20 Oligosaccharide sind entlang der Polypeptidkette dicht gepackt und machen

50% bis 80% des Molekulgewichtes aus [56]. Da ausschließlich O-Glykosylierung der Polypeptidkette stattfindet, ergibt sich eine langgestreckte und filamentöse Struktur. Bei diesem Prozess wird im ersten Schritt ein N-Acetylglucosamin Rest an die Hydroxylgruppe der Aminosäure Threonin bzw. Serin angehängt und anschließend die Kette durch O-Glykosylierung weiterer Zuckermoleküle verlängert. Da N-Acetylglucosamin relativ klein ist, kommt es zu keiner sterischen Hinderung, wie es bei einer N-Glykosylierung der Fall wäre. Dabei werden voluminöse Oligosaccharide angehängt, die keine dichte und gestreckte Anordnung zulassen. Zusätzlich tragen die Zuckerketten eine Vielzahl an Sulfat- und Sialinsäure Resten, die eine stark negative Oberflächenladung verursachen und so einen Schutz gegenüber Abbau durch Glukosidasen bewirken [50][57].

Membranständige Mucine sind zusätzlich durch eine Transmembrandomäne mit zytoplasmatischem Schwanz und funktionelle Bereiche, wie *epidermal-growth-factor-like* (EGF)- und *sea-urchin-sperm-enterokinase-agrin* (SEA) Domänen, gekennzeichnet. Dagegen besitzen sezernierte Mucine von Willebrand Faktor (VWF) Domänen vom Typ C und D, Cystein reiche Domänen und eine C-terminale Domäne, welche alle durch kovalente Disulfidbrücken zur Bildung von umfangreichen polymeren Komplexen beitragen [50][57].

Betrachtet man die chromosomale Lokalisation der Mucine, so fällt eine geclusterte Anordnung der unterschiedlichen Gruppen in bestimmten Regionen auf. Die sezernierten Mucine MUC2, MUC5A, MUC5B, MUC6 und MUC15 liegen zusammen auf Chromosom 11p15.5 [58], wohingegen die membranständigen auf drei verschiedenen Bereiche verteilt sind. So liegen MUC3A, MUC3B, MUC11, MUC12 und MUC17 auf Chromosom 7q22, MUC4, MUC13 und MUC20 auf 3q sowie MUC1 und MUC9 auf 1q21 [59].

1.4 Die Rolle des Mukus und der Mucine bei CED

Bei einer fehlerhaften Schutzfunktion der Mukosa kommt es zu einer verstärkten Aufnahme von bzw. zu einem abnormalen Kontakt der intestinalen Immunzellen mit bakteriellen Bestandteilen des Darminhalts. Als Konsequenz

daraus ergibt sich eine dauernd überschießende Aktivierung des Immunsystems, d.h. eine chronische Entzündung, was bei CED der Fall ist.

Der Aspekt einer möglichen pathophysiologischen Rolle einer gestörten Schleimbarriere wurde bereits untersucht. So konnte eine Arbeitsgruppe zeigen, dass der Phospholipidgehalt im Mukus von Colitis ulcerosa Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vermindert war [49]. Eine kürzlich publizierte Doppel-Blind-Studie ergab, dass oral verabreichtes Phosphatidylcholin (PC), dem Hauptbestandteil der intestinalen Phospholipide, die entzündliche Aktivität im Darm von CU Patienten mit nicht-steroidabhängigem Verlauf im Vergleich zu der Placebogruppe signifikant verbesserte [60]. Die Autoren mutmaßen, dass diese Wirkung durch eine Rekonstitution der geschwächten Schleimbarriere zustande kam.

Bei der Überprüfung der Mucine auf eine mögliche pathogenetische Bedeutung bei CED wurde unter anderem über eine erhöhte Anfälligkeit für Colitis ulcerosa bei Trägern seltener Allele von MUC3A berichtet [61]. Interessanterweise ist das MUC3A Gen in einem Bereich auf Chromosom 7 (7q22) lokalisiert, der vorher durch Kopplungsanalysen mit einer erhöhten Anfälligkeit für CED assoziiert worden war [59]. Bei Colitis ulcerosa konnte eine dünne Schleimschicht beobachtet werden, die mit einem fast vollständigen Verlust der Becherzellen im betroffenen Colon Epithel begründet wurde [62]. Im Gegensatz dazu kam es bei Morbus Crohn zu keinen Veränderungen in der Dicke des Mukus und in der Zahl der Becherzellen [62]. Außerdem konnte bei CED eine erniedrigte O-Glykosylierung der Mucin Polypeptidketten gefunden werden, was die viskosen Eigenschaften des Mukus verändert [63]. Zusätzlich wurde bei Colitis ulcerosa ein erniedrigter Sulfatierungsgrad sowie ein erhöhter Sialisierungsgrad der Kohlenhydratseitenketten festgestellt [64][65]. Diese Veränderungen führen aufgrund einer weniger negativen Oberflächenladung zu einer verminderten Resistenz des Mukus gegenüber Degradation durch bakterielle Glukosidasen und wurden deshalb mit einer erhöhten Anfälligkeit für intestinale Entzündungen in Zusammenhang gebracht.

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten mittels differentieller Expressionsanalyse für CED relevante Gene identifiziert und deren transkriptionelle Regulation näher untersucht werden. Dazu sollten genomweite Expressionsanalysen von Colon- und Ileumbiopsien aus nicht entzündeten Bereichen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten sowie gesunden Probanden mittels Affymetrix DNA-Microarrays erstellt werden. Neben einer Standard biostatistischen Auswertung sollte auch eine weiterführende Pathway bezogene Analyse der DNA-Microarray Daten erfolgen, was zusätzliche biomedizinische Informationen liefern sollte.

So gefundene signifikante Expressionsunterschiede im Vergleich zu den Kontrollen sollten anschließend mit TaqMan real-time RT-PCR validiert werden. Von den verifizierten Genen sollte deren transkriptionelle Regulation durch intensive Promotoranalyse mittels computergestützter Auswerteverfahren der Firma BIOBASE GmbH näher untersucht werden, um zugrunde liegende regulatorische Netzwerke aufzuklären. Diese so erhaltenen potentiellen Regulationsmechanismen sollten schließlich in-vitro bestätigt werden. Dazu sollte ein geeignetes Zellkulturmodell aufgebaut und die Regulation der Genexpression nach Stimulation mit TaqMan real-time RT-PCR gemessen werden.

Zusammen genommen sollte diese Kombination aus ex-vivo, in-vitro und Bioinformatik Experimenten einen neuen Ansatz für die Erforschung komplexer Erkrankungen am Beispiel von CED ermöglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Geräte

ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, USA
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent, USA
Analysewaage: LC620P	Sartorius, Göttingen
Autoklav: FNR 9325E	Fedegari, CH
Brutschränke: B6120	Heraeus, Hanau
Chemilumineszenzdetektor: Lumilmager	Boehringer, Mannheim
Extraktionsroboter: MagNa Pure LC	Roche, CH
Fluidics Station 400	Affymetrix, USA
Gene Chip Scanner 2500	Affymetrix, USA
Horizontalelektrophoresesystem	Bio Rad, München
Hybridization Oven 640	Affymetrix, USA
Küvette: Ultra Microvolume Cell	Amersham, Freiburg
Micro Cell Counter: F-300	Sysmex, JP
PCR-Thermocycler: Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
PCR-Thermocycler: Primus	MWG, Ebersberg
Pipette: Pipetman P (2, 10, 20, 200, 1000 µl)	Gilson, FR
Pipettierroboter: Biomek FX	Beckman Coulter, Krefeld
Spannungsquelle: Power Supply EPS 300	Pharmacia, Freiburg
Spektrophotometer: GeneQuant Pro	Biochrom, UK
Sterilbank: Lamin Air HA 2472	Heraeus, Osterode
Thermomixer: 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer: Vortex Genie 2	Bender und Hohbein, CH
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Zentrifugen: J2-21 M/E	Beckmann, München
	Heraeus, Hanau
Biofuge 15R	Denver Instruments, USA
Microcentrifuge Force7	

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Plastikartikel

384-Well Thermo-Fast plate (Kat.-Nr. TF-0384)	ABgene, UK
Einmalpipetten	Costar, USA
Falcon Tubes (15, 50ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen (2, 10, 20, 200, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Nunc, USA
Latexhandschuhe	Hartmann, Heidenheim
optical adhesive cover (Kat.-Nr. 4311971)	Applied Biosystems, USA
Reaktionsgefäß (0,5, 1,5, 2,0ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	PALL, USA
Zellkulturflaschen: 75 cm ² , blaue Filterkappe	Nunc, USA
Zell-Schaber	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien

CAPE; Caffeic Acid Phenethyl Ester; Kat.-Nr. C8221
LPS; Peptidoglycan from <i>Staphylococcus aureus</i> ; Kat.-Nr. 77140
MDP; N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine hydrate; Kat.-Nr. A9519
MG132; Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal; Kat.-Nr. C2211
TGFβ; Transforming growth factor-β1; Kat.-Nr. T7039
TNFα; Tumor necrosis factor-α; Kat.-Nr. T6674

Diese und alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden von Sigma (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen.

3.1.4 Synthetische Oligonukleotide

3.1.4.1 Assays on demand für die TaqMan real-time RT-PCR

<u>Gen</u>	<u>Kat.-Nr. Applied Biosystems</u>
MUC1	Hs00410317_m1
MUC2	Hs00159374_m1
MUC4	Hs00366414_m1
MUC5AC	Hs00873637_g1
MUC5B	Hs00861534_g1
MUC12	Hs00419779_m1

MUC13	Hs00217230_m1
MUC17	Hs00959753_s1
MUC20	Hs00380658_m1

3.1.4.2 Assays *on demand* für die TaqMan allelische Diskriminierung

<u>Gen</u>	<u>SNP Nr.</u>	<u>Kat.-Nr. Applied Biosystems</u>
MUC2-V116M	rs11825977	C_1841496_10
MUC12-UTR	rs11766125	C_452044_10
MUC13-R502S	rs17512232	C_22272760_10
NOD2-R702W	rs2066844	C_11717468_20
NOD2-G908R	rs2066845	C_11717466_20

3.1.4.3 Assays *by design* für die TaqMan allelische Diskriminierung

<u>Gen</u>	<u>SNP Nr.</u>
MUC1-T22T	rs4072037
MUC4-A585S	rs2246901
MUC5B-W51R	rs885455
MUC17-Q1197R	rs9656065

3.1.5 Enzyme, Inhibitoren und molekularbiologische Kits

Homogenisator: QIAshredder	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 79656
Hybridization Control Kit	Affymetrix, USA, Kat.-Nr. 900454
IVT Labeling Kit	Affymetrix, USA, Kat.-Nr. 900449
MagNa Pure LC DNA isolation Kit	Roche, Mannheim, Kat.-Nr.
Nukleasefreies Wasser	Promega, USA, Kat.-Nr. P1193
One-Cycle cDNA Synthesis Kit	Affymetrix, USA, Kat.-Nr. 900431
Picogreen Assay	Molecular Probes, USA, Kat.-Nr.
Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, USA, Kat.-Nr. 900433
QIAamp Blood DNA midi Kit	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr.
Reverse Transcription System	Promega, USA, Kat.-Nr. A3500
RNAse Inhibitor RNase ZAP	Ambion, USA, Kat.-Nr. 9780
RNA Stabilisierungsreagenz: RNAlater	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 76104
RNeasy mini Kit	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 74104
RNeasy midi Kit	Qiagen, Hilden, Kat.-Nr. 75144

Sample Cleanup Module	Affymetrix, USA, Kat.-Nr. 900371
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA, Kat.-Nr. 4326708

3.1.6 Biologische Materialien

3.1.6.1 Zelllinien

LS174T Adenokarzinom, human, ATCC-Nr. CL-188

LS174T Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) Medium unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (bei 56°C für 30min inaktiviert), 2mM L-Glutamin und 1% (wt/vol) Penicillin/ Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in einem Inkubator kultiviert.

3.1.6.2 Biopsien

Alle Biopsien wurden von Prof. Dr. Wolfgang Stremmel, ärztlicher Direktor der Abteilung Innere Medizin IV am Universitätsklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Dazu wurden jeweils 3 bis 5 Gewebeproben mit einem Durchmesser von 2-5mm aus endoskopisch nicht entzündeten Bereichen (mindestens 10cm Abstand zu entzündeten Gewebe) des terminalen Ileums und Colon transversums von CED Patienten entnommen. Auf die gleiche Weise gewonnene Biopsien von Patienten, die aus anderen Gründen, z.B. Krebsvorsorge, koloskopiert wurden, dienten als Kontrollkollektiv. Die Patienten sind in Tabelle 2 näher charakterisiert.

Tabelle 2 Patientencharakteristik

Erkrankung Krankheitsaktivität	Kontrolle		Morbus Crohn		Colitis Ulcerosa	
		aktiv		aktiv		aktiv
n	14	7	2	14	5	
Geschlecht (m/w)	9/5	1/6	1/1	11/3	2/3	
Altersbereich (Jahre)	22-83	21-53	64-73	22-53	39-70	
Altersdurchschnitt (Jahre)	55	35	69	41	54	

Acht Probanden des Kontrollkollektives zeigten keine Veränderungen im intestinalen Gewebe und bei jeweils einem wurde Divertikulitis, Polyposis coli und Divertikulose, ein MALT-Lymphom, ein Colon Karzinom bzw. infektiöse Colitis diagnostiziert. Um die RNA vor Degradierung zu schützen und somit das

RNA-Expressionsmuster zum Zeitpunkt der Entnahme zu konservieren, wurden die Proben unmittelbar nach Entnahme in das Stabilisierungsreagenz RNAlater eingelegt und bis zur RNA Extraktion bei einer Temperatur von –80°C gelagert.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

LS174T Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz (3 bis 5 Tage) mit PBS gewaschen und 5 bis 10min mit 0,25% Trypsin / 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert, um die Zellen vom Boden abzulösen. Anschließend wurden Trypsin und EDTA durch Aufnahme in Medium mit Serum inaktiviert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen 1:5 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Beim Ernten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, im entsprechenden Volumen RLT-Puffer (Lysepuffer) abgeschabt und das Zelllysat bis zur RNA Extraktion bei –80°C gelagert.

3.2.1.1 Einfrieren und Auftauen

Einfriermedium: 50% RPMI 1640

40% FCS

10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz geerntet und in 1ml eiskaltem Einfriermedium suspendiert. Nach Überführen in Kryoröhrchen wurden die Zellen 24h bei –80°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt, schnell angetaut, anschließend in kaltem PBS gewaschen (300xg, 8min, 4°C) und mit frischem Medium wieder in Kultur genommen.

3.2.1.2 Mycoplasmentest

Die Kontamination von Zelllinien durch Mykoplasmen verändert deren Wachstum und Verhalten generell. Um dies zu verhindern, wurden in regelmäßigen Abständen alle Zelllinien auf Mykoplasmen untersucht und nur Zellen für Experimente verwendet, die eindeutig negativ getestet waren. Dies erfolgte mit Hilfe eines *enzyme-linked immuno sorbent assays* (ELISA) laut Anleitung des Herstellers (Mycoplasma Detection Kit, Roche).

3.2.2 Isolierung von RNA

Total RNA wurde aus Zelllysaten bzw. Biopsien mittels RNeasy-mini oder RNeasy-midi Säulen von Qiagen präpariert. Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung der total RNA über hydrophile Siliziumgel Säulen unter Verwendung geeigneter Puffersysteme. Zuerst wird das Gewebe bzw. die Zellen in einem Guanidiniumisothiocyanat enthaltenden Puffer homogenisiert und lysiert. Dieses chaotrope Salz denaturiert sämtliche Proteine inklusive RNAsen und bewahrt somit die RNA vor Degradierung. Durch Zugabe von Ethanol werden geeignete Bindebedingungen eingestellt und die Lösung auf die Säule gegeben, an die spezifisch total RNA Moleküle länger als 200 Nukleotide binden. Nach mehreren Waschschritten kann die reine und qualitativ hochwertige total RNA eluiert werden.

Hier wurden die 3 bis 5 Biopsien pro Patient und Gewebe gepoolt, in flüssigem Stickstoff fein gemörsernt und im Lysepuffer aufgenommen. Die im Lysepuffer gelagerten Zelllysate wurden aufgetaut und direkt eingesetzt. Die isolierte Gesamt-RNA wurde zum Schluss mit dem entsprechenden Volumen Nuklease-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

3.2.3 Qualitätskontrolle und Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Qualitätsbestimmung der RNA wurde der Agilent 2100 Bioanalyzer zusammen mit dem RNA 6000 LabChip verwendet. Dieses *Lab-On-Chip* Verfahren beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese und der Detektion des in die RNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen. Dazu wird der Chip mit einem Fluoreszenz-Farbstoff-Gemisch beladen, die RNA-Proben

(1 μ l) und ein Größenstandard (Leiter) werden in die entsprechenden Vertiefungen (Wells) auf dem Chip pipettiert. Anschließend erfolgt, durch Anlegen eines elektrischen Feldes, die Auf trennung der einzelnen Proben in einem Separationskanal, wohin sie nacheinander durch Mikrokapillaren gelangen. Die Ergebnisse werden aufgezeichnet und können mit Hilfe der Agilent 2100 BioAnalyzer Software analysiert werden. Dabei wird mit einem speziellen Algorithmus das gesamte Elektropherogramm analysiert und daraus eine sogenannte RNA integrity number (RIN) berechnet, wobei die Werte auf einer Skala von 1 (vollständige Degradation) bis 10 (optimale Qualität) liegen. Dies ermöglicht eine objektive und reproduzierbare Aussage über die Qualität der RNA.

Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. Diese zuverlässige und genaue Methode beruht auf dem Prinzip, dass Licht einer bestimmten Wellenlänge, die möglichst beim Absorptionsmaximum der zu untersuchenden Substanz liegen sollte, beim Durchgang durch wässrige Lösungen abgeschwächt wird. Diese Extinktion ist abhängig von der Konzentration der untersuchten Substanz, ihrem spezifischen Extinktionskoeffizienten und der durchstrahlten Flüssigkeitsschichtdicke. Dieser Zusammenhang wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$E = \epsilon \times c \times D \quad (\text{Lambert-Beersches-Gesetz})$$

E: Extinktion, ϵ : molarer Extinktionskoeffizient ($L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$), c: Konzentration der absorbierenden Moleküle (mol/L), D: durchstrahlte Flüssigkeitsschichtdicke (cm)

Aus dieser Beziehung kann man bei konstanter Schichtdicke (festgelegt durch die verwendete Küvette) und bekanntem Extinktionskoeffizienten (abhängig von der verwendeten Wellenlänge und den Eigenschaften der absorbierenden Teilchen) durch Bestimmung der Extinktion die Konzentration berechnen.

Für die Messung wurden zuerst geeignete Verdünnungen der RNA Proben mit Nuklease-freiem Wasser hergestellt (siehe unten). Für den Leerwert wurde

ebenfalls Nuklease-freies Wasser verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der Proben auf dem GenQuant Pro Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm, was dem Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen der RNA entspricht, gemessen. Da die oben genannte Beziehung nur in einem begrenzten Bereich linear ist, wurden darauf geachtet dass der Absorptionswert bei 260nm den Wert 1,0 nicht überschritt. Gegebenenfalls wurde die RNA stärker verdünnt. Um Proteinverunreinigungen auszuschließen wurde zusätzlich die Extinktion bei 280nm bestimmt und der Quotient E260/E280 gebildet, der bei optimaler Präparation 2,0 beträgt und mindestens >1,8 sein sollte.

3.2.4 Reverse Transkription (RT)

Das Umschreiben von RNA in komplementäre cDNA erfolgte mit dem *Reverse Transcription System* Kit der Firma Promega. Ausgangsmenge war 1µg Gesamt-RNA, die mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 10,4µl gebracht wurde. Dem Ansatz wurden 4µl MgCl₂ (25mM), 2µl 10fach Reverse Transcription Puffer, 2µl dNTP Mix (10mM), 0,5µl Rekombinanter RNasin Ribonuklease Inhibitor, 0,6µl AMV Reverse Transkriptase (15u) und 0,5µl *random-hexamer* Primer (0,5µg) zugegeben, alles für 60min bei 42°C inkubiert und anschließend zur Denaturierung der reversen Transkriptase für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach 5min abkühlen auf Eis wurde die cDNA mit 80µl Nuklease-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert. Da in den anschließenden real-time RT-PCRs auf das Referenzgen 18S ribosomale RNA normalisiert wurde, fanden bei allen RT Reaktionen *random-hexamer* Primer Verwendung, die alle RNA Spezies in cDNA umschreiben.

3.2.5 TaqMan Real-Time RT-PCR

3.2.5.1 TaqMan Expressionsanalyse

Die TaqMan Technologie ist eine real-time RT-PCR Methode, bei der die Markierung des PCR-Produkts durch ein fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid erfolgt, das spezifisch an die entsprechend komplementäre Zielsequenz bindet.

An diese Gensonde ist neben dem Reporterfarbstoff (VIC oder 6-FAM) zusätzlich ein "fluoreszenzauslöschender" Farbstoff (*non-fluorescent quencher*, NFQ) mit gekoppeltem *minor groove binder* (MGB) gebunden. Solange die Sonde intakt ist, wird die von außen zugeführte Energie vom angeregten Fluorophor (Reporter) zu dem benachbarten Chromophor (Quencher) transferiert, ohne dass dabei Strahlung abgegeben wird (sog. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer, FRET) [66]. Während der PCR bindet die Sonde zwischen Forward- und Reverseprimer und wird bei der Synthese des Komplementärstranges durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der eingesetzten Ampli Taq Gold DNA Polymerase abgebaut. Die dadurch bedingte räumliche Trennung von Reporter und Quencher führt dazu, dass der von außen angeregte Reporterfarbstoff ein detektierbares Fluoreszenzsignal abstrahlt, welches nach jedem PCR Zyklus (real-time) gemessen wird. Die Zunahme der Fluoreszenz über die Zeit im Vergleich zu einer Referenzprobe (Kalibrator), ermöglicht eine Aussage über die ursprünglich vorhandene mRNA Menge und somit über die Expressionshöhe. Da die Ampli Taq Gold Polymerase für ihre Exonukleaseaktivität doppelsträngige DNA benötigt, bleiben ungebundene Sonden intakt und tragen nicht zur Fluoreszenz bei. Der MGB legt sich in die kleine Furche (*minor groove*) der bei der Hybridisierung der Sonde an den Targetstrang entstehenden doppelsträngigen DNA, was die Bindungsstabilität erhöht und bei gleicher Schmelztemperatur, die Verwendung von kürzeren (13-20mere anstatt 18-40mere) und dadurch spezifischeren Sonden erlaubt [67]. Die Vorteile des NFQ, auch Darkquencher genannt, liegen in der verbesserten Spektralunterscheidung und im erniedrigten Fluoreszenz-Hintergrund, da es sich dabei um ein Chromophor handelt, welches den Energietransferakzeptor des Reporters darstellt, selber aber kein detektiertes Fluoreszenzsignal abgeben kann.

Die TaqMan real-time RT-PCRs wurden auf dem ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) unter Verwendung des TaqMan Universal PCR Master Mixes (Applied Biosystems) und von optimierten *pre-designed gene-specific TaqMan probe and primer sets (assay on demand*, Applied Biosystems) durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde

in allen Fällen 18S ribosomale RNA (18S-rRNA) verwendet, deren Expression bei sämtlichen Bedingungen unverändert blieb. Während der relativen Quantifizierung diente sie deshalb als aktive Referenz, um unterschiedliche Mengen eingesetzter total RNA zu normalisieren. Der Universal PCR Master Mix enthält neben der oben erwähnten AmpliTaq Gold DNA Polymerase für die TaqMan real-time RT-PCR optimierte Pufferkomponenten, einen Farbstoff (ROX), der als passive Referenz zur Berechnung der Fluoreszenz dient, einen dNTP Mix mit dUTP statt dTTP und als ein weiteres Enzym die Uracil-N-Glycosylase (AmpErase UNG). Dieses Enzym kann DNA-Stränge abbauen, die statt Thymin Uracil enthalten, welche z.B. aus vorhergehenden PCRs stammen können, in denen dTTP durch dUTP ersetzt worden war. Damit verhindert die AmpErase UNG eine Reamplifizierung von kontaminierenden PCR Produkten. Der Reaktionsansatz bestand aus 5µl TaqMan Universal PCR Master Mix, 2µl Nuklease-freies Wasser, 0,5µl *assay on demand* und 2,5µl cDNA (10ng/µl). Nach dem Befüllen (10µl pro well) wurden die 384 Well-Platten (Thermo-Fast) mit selbstklebender Folie (*optical adhesive cover*) verschlossen, kurz zentrifugiert und die real-time RT-PCR mit folgenden Bedingungen im ABI PRISM 7900HT durchgeführt.

real-time RT-PCR Bedingungen:

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
UNG AmpErase Inkubation	50°C	2min
AmpliTaq Gold Aktivierung	95°C	10min
PCR (45 Zyklen)		
– Denaturierung	95°C	15sec
– Annealing/Elongation	60°C	1min

Zur Auswertung wurde die Sequence Detector Software SDS 2.1 (Applied Biosystems, USA) verwendet. Nach Festlegung eines geeigneten Baselinesignalwertes (zur Bestimmung Hintergrundfluoreszenz) sowie eines Schwellenwertes (er muss im exponentiellen Bereich der Kurve liegen), wurde für jede Probe ein *Amplificationplot* generiert. Dabei sind auf der x-Achse der ΔRn -Wert (Rn : Fluoreszenzwert des Reporterfarbstoffes der Probe normalisiert

auf die passive Referenz, ΔR_n : normalisiertes Reportersignal minus Baseline-signalwert) und auf der y-Achse die Zahl der PCR Zyklen aufgetragen. Aus dem Graphen wurde der C_t (*Threshold Cycle*)-Wert berechnet, welcher als Schnittpunkt der Kurve mit dem Schwellenwert definiert ist und den Zyklus der PCR widerspiegelt, an dem das Reportersignal erstmals das Baselinesignal übersteigt. Danach wurde durch die ΔC_t (C_t Probe minus C_t endogene Kontrolle) Berechnung auf die endogene Kontrolle (hier 18S-rRNA) normalisiert. Die Normalisierung auf eine Kalibratorprobe erfolgte durch die $\Delta\Delta C_t$ Berechnung (ΔC_t Probe minus ΔC_t Kalibratorprobe), wobei der Wert für die Kalibratorprobe auf den Wert 0 gesetzt wird. Schließlich wurde anhand der Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ die Änderung der Expression bezogen auf die Kalibratorprobe, die dabei den Wert 1 erhält, berechnet und graphisch dargestellt.

Diese Art der Auswertung wird als $\Delta\Delta C_t$ Methode zur relativen Quantifizierung bezeichnet und bedeutet einen normalisierten Signalwert der Probe relativ zum normalisierten Signalwert der dazugehörigen Kalibratorprobe.

3.2.5.2 Allelische Diskriminierung

Beim der allelischen Diskriminierung handelt es sich ebenfalls um eine 5'-3'-Exonuklease Reaktion nach dem im vorherigen Kapitel bereits ausführlich beschriebenen Prinzip. Im Unterschied zur Expressionsanalyse werden im Reaktionsansatz zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte (VIC und 6-FAM) Sonden verwendet, die sequenzspezifisch für je ein Allel sind. Die Reaktionsbedingungen sind so gewählt, dass nur bei vollständiger Sequenzübereinstimmung die Sonde ausreichend stark hybridisiert, um von der AmpliTaq Gold DNA Polymerase abgebaut zu werden. Die Sonden des nicht vorhandenen Allels hybridisieren nicht stark genug, bleiben intakt und tragen deshalb nicht zur Fluoreszenz bei. Da die verwendeten Reporterfarbstoffe bei unterschiedlichen Wellenlängen emittieren, kann die Amplifikation jedes Allels spezifisch bestimmt werden. Es erfolgt eine einmalige Endpunktmessung der Fluoreszenz am Ende der PCR. Wird dabei nur die Fluoreszenz eines Farbstoffes detektiert, handelt es um Homozygotie für das eine Allel. Im umgekehrten Fall liegt das andere Allel homozygot vor. Können beide

Fluoreszenzen gemessen werden, liegen beide Allele vor und es handelt sich um Heterozygotie.

Zur allelischen Diskriminierung wurden, sofern erhältlich, *TaqMan pre-designed SNP genotyping assays (assay on demand, Applied Biosystems)* verwendet. Ansonsten wurde der *custom Taqman SNP genotyping assay service (assay by design)* von Applied Biosystems in Anspruch genommen, bei dem ausgehend von der Sequenz ein Assay entworfen und optimiert wird. Der Reaktionsansatz bestand aus 5µl TaqMan Universal PCR Master Mix, 2µl Nuklease-freies Wasser, 0,5µl *assay on demand* bzw. *assay by design* und 1µl DNA (10ng/µl). Nach dem Befüllen mit dem Biomek FX Pipettierroboter (10µl pro well) wurden die 384 Well-Platten (Thermo-Fast) mit selbstklebender Folie (*optical adhesive cover*) verschlossen, kurz zentrifugiert und die PCR im ABI PRISM 7900HT oder im MWG Primus durchgeführt. Die abschließende Fluoreszenzmessung erfolgte in beiden Fällen im ABI PRISM 7900HT. Zur Auswertung wurde die Sequence Detector Software SDS 2.1 (Applied Biosystems, USA) verwendet. Dabei wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte in Form einer Punktewolke – auch Allelplot genannt – dargestellt, von der ausgehend die drei möglichen Genotypen (homozygot Allel 1, homozygot Allel 2 und heterozygot) definiert wurden. Abschließend wurden die Ergebnisse in Textformat exportiert und mit weiteren Programmen näher analysiert.

3.2.6 DNA Isolierung aus EDTA-Blut

Genomische DNA wurde aus EDTA-Vollblut Proben mit dem MagNa Pure LC Extraktionsroboter unter Verwendung des QIAamp Blood DNA Midi (Qiagen) oder MagNa Pure LC DNA isolation (Roche) Kits isoliert. Die DNA wurde in Mikrotiterplatten pipettiert und die Konzentration mit dem Picogreen Assay (Molecular Probes) bestimmt. Anschließend wurde die DNA mit dem Biomek FX Pipettierroboter (Beckman Coulter) und der BFX-Normalisierungssoftware auf eine Konzentration von 10ng/µl normalisiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

3.2.7 DNA-Microarray Analyse

Für die genomweiten Expressionsanalysen wurden die GeneChips HGU133A und HGU133B der Firma Affymetrix verwendet. Dieses DNA-Microarray Set umfasst rund 22.000 bekannte humane Gene und mehr als 33.000 ESTs. Die genspezifischen Oligonukleotide werden durch ein photolithographisches Verfahren *in situ*, d.h. direkt auf der Chip-Oberfläche, synthetisiert. Ausgehend von 1-15 μ g total-RNA wird im ersten Schritt unter Verwendung eines T7-oligo-d(T)₂₄ Primers doppelsträngige cDNA synthetisiert. Als Konsequenz daraus tragen alle gebildeten cDNA Moleküle den bakteriophagen T7 Promotor. Nach einem Aufreinigungsschritt produziert die T7-RNA-Polymerase in der anschließenden *in vitro* Transkription biotinylierte cRNA. Im Gegensatz zur cDNA Synthese kommt es hierbei zu einer 100 bis 200 fachen Amplifikation, da ein cDNA Molekül mehrere Male als Matrize dienen kann. Die cRNA wird aufgereinigt, durch eine metallische Hydrolyse auf eine durchschnittliche Länge von 35 bis 200 Nukleotide fragmentiert und für 16 Stunden bei 45°C und 60 U/min in einem Hybridisierungscocktail auf die DNA-Microarrays hybridisiert. Danach werden die Arrays gewaschen, mit einem Streptavidin-Phycoerythrin Komplex gefärbt und gescannt.

Hier wurden pro untersuchtem Kollektiv (Kontrolle, MC, CU) jeweils vier Mal 2,5 μ g total-RNA unterschiedlicher Individuen aus dem Colon- bzw. Ileum gepoolt und für die cRNA Synthese verwendet. Aus den gescannten Bildern wurden mit der Microarray Suite 5.0 Software (Affymetrix, USA) die Expressionssignale sowie der *detection call* berechnet. Der *detection call* sagt aus, ob ein Gen exprimiert (*present*: P), schwach exprimiert (*marginal*: M), oder nicht exprimiert (*absent*: A) wird. Jeder DNA-Microarray wurde zunächst einzeln analysiert, wobei die Gesamtfluoreszenz jeweils auf den Wert 100 skaliert wurde (*single array analysis*). Die zusätzlich generierte Report Datei erlaubte eine ausführliche Qualitätskontrolle, wobei dem Skalierungsfaktor, der Hintergrundfluoreszenz, den Signalwerten der Hybridisierungskontrollen und den 3'-5' Verhältnissen der internen Kontrollen die größte Bedeutung zukam. Der niedrigste Wert des Skalierungsfaktors unterschied sich nicht mehr als um den Faktor zwei vom höchsten, was eine gute Vergleichbarkeit der einzelnen

DNA-Microarrays untereinander gewährleistete. Die Werte für die unspezifische Hintergrundfluoreszenz lagen ebenfalls unterhalb des Grenzwertes, was eine spezifische Hybridisierung beweist. Sämtliche Hybridisierungskontrollen, welche vor der Hybridisierung in unterschiedlichen Konzentrationen eingespielt wurden, konnten als exprimiert detektiert werden. Somit wurde sichergestellt, dass auch sehr niedrig exprimierte Gene ein messbares Signal zeigten. Bei den internen Kontrollen β -Actin und Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden jeweils Expressionssignale am 3'- und am 5'-Ende bestimmt. Aus dem berechneten 3' zu 5' Verhältnis, das den Faktor drei nie überschritt, konnte eine nicht vollständige cDNA- bzw. cRNA Synthese ausgeschlossen werden. Im zweiten Schritt wurden die CED Proben jeweils auf die gesunde Kontrollprobe bezogen (*comparison analysis*). Dabei wurde der *change call* berechnet, der angibt, ob es zu einer Erhöhung (*increase*: I bzw. *minor increase*: MI), zu einer Verminderung (*decrease*: D bzw. *minor decrease*: MD) oder zu keiner Veränderung (*no change*: NC) der Transkription kam. Zusätzlich wurde die Höhe der Expressionsänderung als Zahlenwert angegeben (*fold change*). Alle Daten sind als *fold changes* der Transkript-Level bezogen auf die jeweilige Kontrolle angegeben.

Der gesamte Datensatz ist unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> im NCBI Gene Expression Omnibus unter der Kennung GSE1152 zugänglich. Aufgrund der stark gestiegenen Zahl hochdichter Microarray Experimente und der daraus resultierenden Datenmenge, wurde 1999 am NCBI dieser öffentliche Speicherort eingerichtet. GEO zeichnet sich durch ein flexibles und offenes Design aus, was einen effizienten Einreichungsprozess und eine benutzerfreundliche Analyse und Visualisierung der Vielzahl an Ergebnissen ermöglicht [68]. Alle dort abgelegten Daten müssen den *minimum information about a microarray experiment* (MIAME) Richtlinien gehorchen [69]. Diese exakte Beschreibung der Experimente erleichtert eine eindeutige Interpretation und eventuelle Verifizierungswiederholungen.

3.2.8 Statistische Datenauswertung

Zur weiterführenden statistischen Auswertung und zur graphische Darstellung der Daten wurde das Office Paket (Microsoft Corporation, USA) und SigmaPlot (SPSS Inc., USA) verwendet. Expressionsdaten sind als die mittlere \pm Standardabweichung dargestellt. Dabei wurde auf statistische Signifikanz mit dem Student'schen t-Test geprüft. Die Daten der allelischen Diskriminierung wurden einer *frequency table* und *Chi-square test* Analyse im MedCalc Programm (Frank Schoonjans, Be) unterzogen. In beiden Fällen galt ein P-Wert $< 0,05$ als statistisch Signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Globale mRNA Expressionsprofile von CED-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden

Im ersten Schritt wurde unter Verwendung von DNA-Microarrays eine genomweite Expressionsanalyse intestinaler Epithelzellen durchgeführt. Dazu wurde total RNA aus Koloskopien von Patienten mit Morbus Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und Kontrollprobanden ohne CED (Co) isoliert und deren Expressionsprofile mittels Affymetrix HG U133A und HG U133B Genchips analysiert.

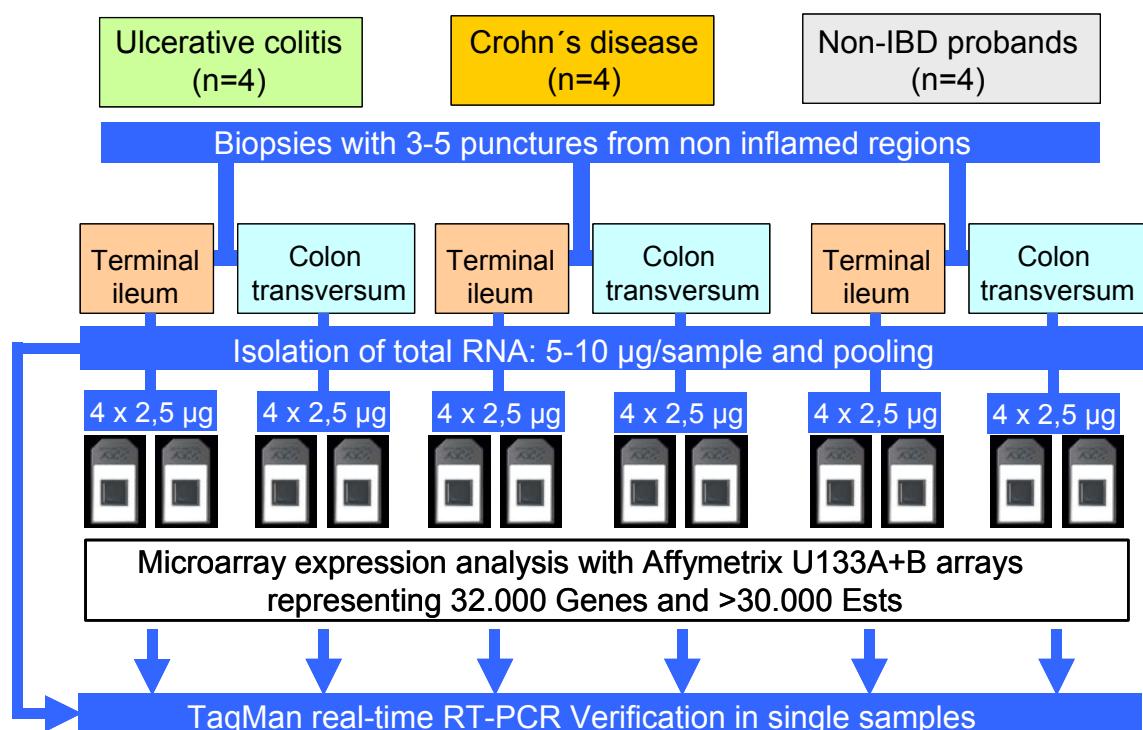


Abb. 5 RNA Pooling Strategie bei den DNA-Microarray Experimenten

Die Proben wurden von einem spezialisierten Gastroenterologen aus nicht entzündeten Bereichen des Ileums und des Colons entnommen. Um einerseits die interindividuellen Variationen der Genexpression zu minimieren und

andererseits noch ausreichend Material für Bestätigungsexperimente in Einzelbiopsien übrig zu behalten, wurden pro Gewebe jeweils vier RNAs der drei untersuchten Kollektive gepoolt (Abb. 5). Dabei wurde auf ähnliche Charakteristik bezüglich des aktuellen Erkrankungszustandes, des Alters und der durchgeführten Behandlung geachtet. Das Durchschnittsalter der Morbus Crohn Patienten betrug 32, der Colitis ulcerosa Patienten 37 und der Kontrollgruppe 55 Jahre. Da die Darmmucosa aus einer Vielzahl an Immun- und Nichtimmunzellen besteht, wurde zuerst die Expression ausgesuchter Markergene verschiedener Zelltypen (Tabelle 3) untersucht.

Tabelle 3 Expressionswerte von Markergenen der Mukosa

Cell type/ Gene	Control expression ileum	FC Crohn	FC Colitis	Control expression colon	FC Crohn	FC Colitis
Epithelial cells						
FABP	5546	-1.6	-1.5	4867	1.1	1.0
Villin	2999	1.6	1.2	3047	-1.1	1.1
Occludin	764	1.3	-1.1	825	1.1	1.3
Immune cells						
CD45	50	1.2	1.1	6	7.0	2.8
CD14	109	-1.2	-1.4	123	1.1	1.1
CD16	52	1.1	-1.1	42	2.1	6.1
CD80	50	-1.2	1.0	38	1.1	-1.3
CD86	30	-1.1	-1.4	23	1.0	1.3
Mesenchymal cells						
Epimorphin	3	-	-	3	-	-

Ab einer durchschnittlichen Fluoreszenzintensität von 50 gilt ein Gen im jeweiligen Gewebe als signifikant exprimiert. Der *fold change* (FC) der Expression in den Patientengruppen jeweils bezogen auf die Kontrolle ist angeben.

Die DNA-Microarray Ergebnisse zeigten sowohl im Colon als auch im Ileum hohe Expressionswerte für epithelzellspezifische Gene wie *fatty acid binding protein* (FABP), *villin* und *occludin*. Die Markergene für Pan-Leukozyten (CD45), Monozyten (CD14), Neutrophile (CD16) und Antigen präsentierende Zellen (CD80, CD86) waren nur sehr niedrig exprimiert. Eine kaum zu detektierende Expression zeigte der mesenchymale Marker *epimorphin*. Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Expressionsprofile der untersuchten Biopsien hauptsächlich die Expression epithelialer Zellen wiederspiegeln und Immunzellen nicht wesentlich dazu beitragen.

4.2 Biostatistische Auswertung der DNA-Microarray Ergebnisse

Um sich auf aussagekräftige Regulationseignisse zu beschränken, gingen in die biostatistische Auswertung nur Gene mit folgenden Eigenschaften ein: Die Expression bei CED unterscheidet sich, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, mindestens um den Faktor zwei (*fold change* ≥ 2) und der *detection p-value* ist statistisch valide, d.h. pro Gen maximal ein minus in den drei Kollektiven. Deswegen wurde der von der Microarray Suite Software als Zahlenwert ausgegebene *detection p-value* zuerst in eine der drei Kategorien ++, + oder – umgewandelt, wobei P Werte kleiner 0,05 zu ++, P Werte zwischen 0,05 und 0,5 zu + und P Werte größer 0,5 zu – konvertiert wurden.

Tabelle 4 Biostatistische Auswertung der DNA-Microarrays

Disease	Ileum			Colon		
	no. of genes	%	no. of genes	%		
Crohn and Colitis common high	29	2,4%	157	6,1%		
Crohn specific high	531	43,9%	662	25,7%		
Colitis specific high	64	5,3%	321	12,5%		
Crohn and Colitis inversely regulated	5	0,4%	37	1,4%		
Crohn and Colitis common low	65	5,4%	404	15,7%		
Crohn specific low	469	38,8%	464	18,0%		
Colitis specific low	47	3,9%	528	20,5%		
Regulated	1210		2573			

Bei CED Patienten zeigten im Ileum 1210 Gene und im Colon 2573 eine differentielle Regulation (Tabelle 4). Im Ileum von Morbus Crohn Patienten waren 531 Gene (43,9% aller im Ileum regulierten Gene) spezifisch hoch- und 469 Gene (38,8%) spezifisch runterreguliert, während bei Colitis ulcerosa die Zahl mit 64 hoch- (5,3%) und 47 runterregulierten (3,9%) wesentlich geringer war. Im Vergleich dazu waren im Colon von CED Patienten insgesamt mehr als doppelt so viele Gene differentiell reguliert. Die Mehrzahl der Gene (1396 Gene, 54,3%) zeigte eine verminderte Expression, wovon 404 Gene (15,7%) spezifisch bei Morbus Crohn und 464 Gene (18,0%) spezifisch bei Colitis ulcerosa Patienten runterreguliert waren. Die Gesamtsumme an hochregulierten Genen im Colon betrug 1140 (44,3%). Davon waren 662 (25,7%) Morbus Crohn und 321 (12,5%) Colitis ulcerosa spezifisch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Morbus Crohn Patienten

annähernd gleich viele differentiell regulierte Gene sowohl im Ileum als auch im Colon gefunden wurden. Bei Colitis ulcerosa Patienten wurde die Mehrzahl der dysregulierten Gene im Colon identifiziert, was den Ort der stärksten pathologischen Veränderung wiederspiegelt. Trotz überlappender Expressionsprofile der beiden CED Subtypen, konnten jedoch auch eine Vielzahl an Genen, spezifisch für die jeweilige Krankheit, gefunden werden. Somit lassen sich Gemeinsamkeiten aber auch klare Unterschiede in den pathophysiologischen Expressionsmustern vermuten.

4.3 Pathway bezogene Auswertung der DNA-Microarray Ergebnisse

Zur detaillierteren Analyse wurden die DNA-Microarray Daten im nächsten Schritt einer biomedizinischen Pathway Analyse unterzogen. Diese Methode wurde am Institut für Klinische Chemie in Regensburg etabliert und stellt eine Eingruppierung aller bisher bekannten humanen Gene in biomedizinische Kategorien dar. Diese, auch als Synopsis bezeichnete Genlistensammlung, umfasst 73 Hauptkategorien, die sich in über 500 Subkategorien aufgliedern. Insgesamt enthält sie 32451 Einträge, wobei aber Gene auch mehr als ein Mal, dann jedoch nur in verschiedenen Kategorien, vorkommen können. Die thematische Klassifizierung erfolgte dabei nach verschiedenen Kriterien wie Zugehörigkeit zu metabolischen bzw. biochemischen Prozessen (Fettstoffwechsel), zu Gengruppen bzw. Genfamilien (Mucine, ABC-Transporter), zu Signalkaskaden (NF κ B Signalweg), zu Zielgenen von Transkriptionsfaktoren (NF κ B *target genes*) und zu Organellen (Lysosom). Weitere Kategorien waren Expression in bestimmten Geweben (im Colon exprimierte Gene), krankheitsrelevante Gene (*connective tissue disease*) sowie Gene die in Kandidatenloci für Krankheiten liegen (CED Kandidatenloci). Darauf lassen sich universell sowohl hochdichte Affymetrix DNA-Microarray Daten, als auch Expressionswerte von *customized*, niedrig dichten Microarrays abbilden, was eine Identifizierung von besonders betroffenen Kategorien erlaubt. Weiterhin

können so koordiniert regulierte Gengruppen bzw. regulatorische Netzwerke gefunden werden.

Tabelle 5 zeigt die Zusammenfassung der Pathway bezogenen Analyse der DNA-Microarrays. Aufgeteilt nach den vier untersuchten Bedingungen (MC Ileum, MC Colon, CU Ileum und CU Colon) sind für jede der 73 Kategorien sowohl die absolute Zahl als auch der Prozentwert, bezogen auf die Anzahl der jeweils auf den DNA-Microarrays repräsentierten Gene, der hoch- und runterregulierten Gene angegeben. Bei der Interpretation wurde nach hohen Prozentzahlen gesucht, die besonders betroffene Kategorien anzeigen. Traten allerdings in Kategorien mit insgesamt nur wenigen Einträgen differentiell regulierte Gene auf, ergaben sich automatisch hohe Prozentzahlen (z.B. MC Colon Nr. 31: Sulfatide / Cholesterinsulfat), die kritisch betrachtet wurden. Andererseits wurde aber auch die absolute Zahl an differentiell regulierten Genen betrachtet um betroffene Kategorien zu identifizieren, da sich bei einer großen Zahl an Einträgen nur niedrige Prozentzahlen ergaben (z.B. Nr. 64: CED Kandidatenloci und 65: im Colon exprimierte Gene).

Es zeigte sich eine besonders gehäufte differentielle Regulation in den Kategorien 33 bis 44, die insgesamt im Colon stärker ausgeprägt war. Darin enthalten waren Gene die am Aufbau und Funktion der extrazellulären Matrix sowie der intestinalen Barriere beteiligt sind. Besonders auffällig war dabei Kategorie 38 Proteoglykane und Mucine, in der bei allen vier Bedingungen, also auch im Ileum, eine hohe Zahl an Genen vermindert exprimiert war. Zusätzlich waren im Colon der Fettstoffwechsel (Nr. 26), die Detoxifikation (Nr. 21 und Nr. 22) sowie verschiedene weitere Kategorien (Nr. 19, Nr. 52 usw.) betroffen. Der Verlust der Detoxifikation im Colon bei CED konnte bereits in einer weiterführenden Untersuchung bestätigt werden [45]. Betrachtet man die jeweiligen Gesamtsummen über alle 73 Kategorien in der letzten Zeile, so zeigten sich auch mit dieser Auswertemethode die im vorherigen Kapitel bereits beschriebenen Phänomene mit einem insgesamt wesentlich stärker betroffen Colon. Es überwogen die runterregulierten Gene, wohingegen im Ileum die Zahl der vermindert oder erhöht exprimierten Gene nahezu gleich war.

Tabelle 5 Pathway bezogene Auswertung der DNA-Microarray Analyse bei CED

Pathway	on chip	Crohn ileum Ch			Colitis ileum Ch			Crohn colon Ch			Colitis colon Ch		
		I	%	D	%	I	%	D	%	I	%	D	%
1 Wnt/Frizzled	224	12	5,4%	7	3,1%	0	0,0%	0	0,0%	16	7,1%	7	3,1%
2 Notch/Hedgehog/Stem cell genes	739	30	4,1%	21	2,8%	2	0,3%	4	0,5%	44	6,0%	24	3,2%
3 CD genes (Leukocyte genes)	1091	37	3,4%	73	6,7%	12	1,1%	22	2,0%	57	5,2%	46	4,2%
4 Receptors and Ligands/Tetraspans/Pentaspans	269	10	3,7%	16	5,9%	0	0,0%	1	0,4%	9	3,3%	22	8,2%
5 ABC Transporter/ATPases/Walker motif family	93	2	2,2%	2	2,2%	0	0,0%	0	0,0%	3	3,2%	5	5,4%
6 Ion Channels/Porins/solute carriers	518	14	2,7%	15	2,9%	1	0,2%	8	1,5%	14	2,7%	19	3,7%
7 Phagosome/Annexines/Connexins/Copins	603	16	2,7%	27	4,5%	1	0,2%	6	1,0%	25	4,1%	35	5,8%
8 Rab/Ras pathway	231	8	3,5%	8	3,5%	0	0,0%	0	0,0%	20	8,7%	11	4,8%
9 Rac/Cdc42 regulatory pathways	41	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	4,9%	3	7,3%
10 Lamellar body/GPI-anchored/Golgi	600	21	3,5%	23	3,8%	2	0,3%	14	2,3%	29	4,8%	25	4,2%
11 Adapter proteins/PDZ family/Domain proteins	1023	24	2,3%	22	2,2%	1	0,1%	5	0,5%	42	4,1%	41	4,0%
12 Cytoskeleton/Actin/Tubulin/Myosin/ Spectrin	314	7	2,2%	8	2,5%	1	0,3%	1	0,3%	8	2,5%	14	4,5%
13 ABCA1/ABCA7/NPC/Cav associated	445	17	3,8%	16	3,6%	2	0,4%	3	0,7%	21	4,7%	30	6,7%
14 Migration/polarization	993	23	2,3%	34	3,4%	6	0,6%	11	1,1%	41	4,1%	64	6,4%
15 TNF receptor signaling	168	2	1,2%	5	3,0%	1	0,6%	0	0,0%	5	3,0%	6	3,6%
16 TNF/PI3 kinase coupling	39	1	2,6%	3	7,7%	1	2,6%	0	0,0%	2	5,1%	3	7,7%
17 Apoptosis/Proteasome	728	19	2,6%	24	3,3%	3	0,4%	1	0,1%	31	4,3%	29	4,0%
18 Mitochondrion/Peroxisome	402	3	0,7%	10	2,5%	0	0,0%	2	0,5%	15	3,7%	28	7,0%
19 Insulin/Glukose/Glutathione/Glucuronides/Energy/b-Oxidation/Fucose	421	9	2,1%	13	3,1%	1	0,2%	2	0,5%	18	4,3%	36	8,6%
20 Thrombosis/Haemostasis	41	6	14,6%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	4,9%	0	0,0%
21 Detoxifikation: Phase I / Cytochromes	142	3	2,1%	5	3,5%	0	0,0%	4	2,8%	5	3,5%	12	8,5%
22 Detoxifikation: Phase II	83	5	6,0%	0	0,0%	1	1,2%	0	0,0%	3	3,6%	5	6,0%
23 Heat shock	70	4	5,7%	3	4,3%	1	1,4%	1	1,4%	3	4,3%	6	8,6%
24 NO/Thioredoxin/Metallothioneins/Selenoproteins	290	3	1,0%	8	2,8%	1	0,3%	1	0,3%	7	2,4%	16	5,5%
25 Cholesterin metabolism/ SREBP1/2	70	2	2,9%	3	4,3%	1	1,4%	1	1,4%	5	7,1%	1	1,4%
26 Fatty acid metabolism	284	7	2,5%	8	2,8%	1	0,4%	6	2,1%	15	5,3%	23	8,1%
27 Glycerophospholipids	15	0	0,0%	3	20,0%	0	0,0%	1	6,7%	1	6,7%	2	13,3%
28 Phosphatidylinositol and Ca++ metabolism/ GPI-anchored receptors	256	13	5,1%	9	3,5%	0	0,0%	7	2,7%	12	4,7%	6	2,3%
29 Sphingolipids	19	0	0,0%	0	0,0%	1	5,3%	0	0,0%	0	0,0%	1	5,3%
30 Gangliosides	54	0	0,0%	1	1,9%	0	0,0%	0	0,0%	1	1,9%	4	7,4%
31 Sulfatides/Cholesterol sulfate	13	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	23,1%
32 Glykosylation/Stylation/CTP/UTP/GTP	270	7	2,6%	9	3,3%	0	0,0%	4	1,5%	11	4,1%	24	8,9%
33 Proteinases/Serpins/ MMPs/ADAMS/ Kallikreins/Calpains/Cystatins	253	11	4,3%	5	2,0%	1	0,4%	1	0,4%	12	4,7%	11	4,3%
34 Integrins	32	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	6,3%	2	6,3%
35 TGFb-family/BMP/TGFb/Activins/Inhibins	203	19	9,4%	7	3,4%	2	1,0%	3	1,5%	12	5,9%	12	12,3%
36 Collagens	99	7	7,1%	4	4,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	3,0%	8	8,1%
37 Laminins	34	8	23,5%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	7	20,6%	0	0,0%
38 Proteoglycans/Mucins	95	4	4,2%	8	8,4%	0	0,0%	8	8,4%	4	4,2%	10	10,5%
39 Hyaluronan	104	3	2,9%	2	1,9%	0	0,0%	0	0,0%	4	3,8%	8	7,7%
40 Elastin/Fibrillin/Keratin/Fibulin	143	3	2,1%	2	1,4%	1	0,7%	1	0,7%	3	2,1%	5	3,5%
41 Connective tissue disease	210	17	8,1%	7	3,3%	3	1,4%	0	0,0%	16	7,6%	17	8,1%
42 EGF family	131	9	6,9%	1	0,8%	2	1,5%	0	0,0%	8	6,1%	0	0,0%
43 Junctional control	145	6	4,1%	5	3,4%	2	1,4%	0	0,0%	6	4,1%	7	4,8%
44 other ECM proteins	117	10	8,5%	2	1,7%	2	1,7%	0	0,0%	7	6,0%	0	0,0%
45 G protein receptors and G proteins	464	23	5,0%	11	2,4%	5	1,1%	4	0,9%	11	2,4%	8	1,7%
46 Kinases + Phosphatases	679	14	2,1%	16	2,4%	2	0,3%	3	0,4%	33	4,9%	24	3,5%
47 NFkB signaling/NFkB target genes	85	2	2,4%	3	3,5%	0	0,0%	0	0,0%	5	5,9%	3	3,5%
48 ZNF202 target genes and coregulators	27	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	4	14,8%	0	0,0%
49 POLII/TAFs/CDK/Cyclins/CDCs/ CDT-kinases in transcriptional control	266	6	2,3%	8	3,0%	1	0,4%	0	0,0%	13	4,9%	9	3,4%
50 Nucleosome/Nuclear matrix	109	4	3,7%	1	0,9%	0	0,0%	0	0,0%	4	3,7%	5	4,6%
51 Nuclear receptors	53	2	3,8%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	3	5,7%	1	1,9%
52 PPAR/LxR/PxR/RxR/FxR target genes	970	53	5,5%	41	4,2%	10	1,0%	17	1,8%	62	6,4%	79	8,1%
53 ZNF TCFs	446	10	2,2%	4	0,9%	3	0,7%	0	0,0%	18	4,0%	8	1,8%
54 Homeobox	71	0	0,0%	2	2,8%	0	0,0%	2	2,8%	2	2,8%	0	0,0%
55 RNA-Polymerases I and III	21	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	0,0%	1	4,8%	1	4,8%
56 Other specific transcription factors	377	11	2,9%	9	2,4%	2	0,5%	2	0,5%	18	4,8%	13	3,4%
57 Splicing	65	0	0,0%	1	1,5%	0	0,0%	0	0,0%	2	3,1%	1	1,5%
58 Translation machinery	257	4	1,6%	7	2,7%	0	0,0%	0	0,0%	4	1,6%	12	4,7%
59 IL-1b/Cytokines/Chitinases/Poetins	95	1	1,1%	2	2,1%	0	0,0%	1	1,1%	4	4,2%	1	1,1%
60 IFNg regulated genes	216	15	6,9%	8	3,7%	4	1,9%	1	0,5%	19	8,8%	14	6,5%
61 Homocysteine	33	1	3,0%	1	3,0%	0	0,0%	0	0,0%	2	6,1%	1	3,0%
62 Lipid sensitive genes in C. elegans	275	9	3,3%	6	2,2%	1	0,4%	0	0,0%	18	6,5%	15	5,5%
63 complement, defensins, Granzymes	122	6	4,9%	5	4,1%	3	2,5%	0	0,0%	8	6,6%	4	3,3%
64 IBD candidate loci	976	18	1,8%	21	2,2%	2	0,2%	5	0,5%	34	3,5%	39	4,0%
65 Colon expressed genes	1769	70	4,0%	73	4,1%	7	0,4%	24	1,4%	97	5,5%	109	6,2%
66 not yet classified to pathways	3058	59	1,9%	67	2,2%	16	0,5%	11	0,4%	109	3,6%	130	4,3%
67 unknowns	5119	78	1,5%	75	1,5%	17	0,3%	15	0,3%	137	2,7%	136	2,7%
68 Replikation	126	0	0,0%	1	0,8%	1	0,8%	0	0,0%	5	4,0%	6	4,8%
69 Apos/Lipid binding proteins	29	1	3,4%	1	3,4%	0	0,0%	0	0,0%	2	6,9%	0	0,0%
70 Lysosome/CLNsSTART	51	5	9,8%	1	2,0%	1	2,0%	0	0,0%	4	7,8%	3	5,9%
71 Purin and Pyrimidin metabolism/FAD/NAD	109	4	3,7%	5	4,6%	0	0,0%	1	0,9%	3	2,8%	8	7,3%
72 Placenta/Prostate/Sperm/Testes	135	6	4,4%	0	0,0%	0	0,0%	2	1,5%	3	2,2%	10	7,4%
73 Nucleotide/Nucleoside	267	7	2,6%	11	4,1%	5	1,9%	4	1,5%	17	6,4%	12	4,5%
	28385	811	799	133	210	1185	1291	885	1491				

Für jede der 73 Hauptkategorien (Pathway) ist, aufgeteilt nach den vier untersuchten Bedingungen MC Ileum, MC Colon, CU Ileum und CU Colon, die Zahl der hoch- (I) und runterregulierten (D) Gene dargestellt. Zusätzlich ist der Prozentwert, bezogen auf die jeweilige Zahl der auf den DNA-Microarrays repräsentierten Gene (on chip), angegeben. Besonders betroffene Kategorien sind gelb hervorgehoben.

Betrachtet man die am Prozess der Zellerneuerung und Homöostase des intestinalen Epithels beteiligten Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren sowie deren Zielgene im Detail, so fallen eine Vielzahl an bei CED differentiell regulierten Genen auf (Tabelle 6). Dabei waren innerhalb der wingless, notch und hedgehog Kaskaden sowie innerhalb der HNF1-, CDX2- und GATA4 Zielgene induzierte und reprimierte Gene zahlenmäßig gleichmäßig verteilt. Die Expressionen von HNF1 und GATA4 selbst war unverändert, wohingegen sowohl CDX1 als auch CDX2 im Colon bei MC und CU vermindert transkribiert wurden. Auffällig war die Regulation der Gene der TGF β /BMP Signalkaskade (Abb. 6), innerhalb der alle bei CED differentiell regulierten Gene des TGF β Signalwegs ausschließlich induziert waren. Im BMP Signalweg dagegen waren, mit der Ausnahme des BMP TypII Rezeptors sämtliche bei CED differentiell regulierten Gene vermindert exprimiert.

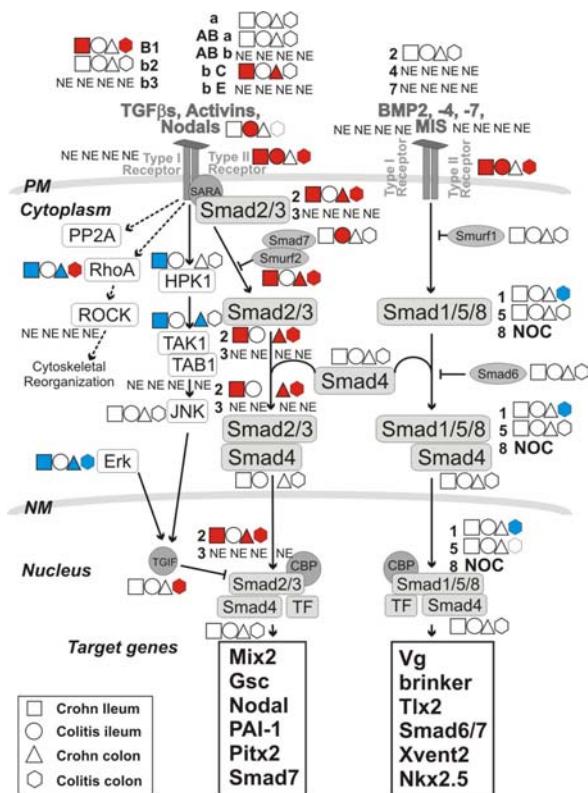


Abb. 6 Darstellung der TGF β /BMP Signalkaskade inklusive der DNA-Microarray Ergebnisse. Für jedes auf den DNA-Microarrays repräsentierte Gen ist die differentielle Regulation bei CED in den vier untersuchten Bedingungen dargestellt (Viereck: MC Ileum, Kreis: CU Colon, Dreieck: MC Ileum, Sechseck: MC Colon). Rote Symbole bedeuten eine Hoch-, blaue eine Herabregulation und weiße keine Änderung der Expression bezogen auf die jeweilige Kontrolle. Nicht exprimierte Gene sind mit NE (not expressed) gekennzeichnet. NOC, not represented on chip

Tabelle 6 Differentielle Regulation von Genen der wingless/β-catenin, TGFβ/BMP, notch, hedgehog, HNF, CDX2 und GATA4 Signalkaskaden bei CED

ungene	title	symbol	Normal ileum Sig	Normal ileum p	Colitis ileum Sig	Colitis ileum p	Normal ileum Fc	Colitis ileum Ch	Normal ileum Sig	Colitis ileum p	Colitis ileum Fc	Colitis ileum Ch	Normal colon Sig	Normal colon p	Colitis colon Sig	Colitis colon p	Colitis colon Fc	Colitis colon Ch
WNT/b-catenin																		
Hs.152213	WNT5A	WNT5A	34.0 +	77.3 ++	2.5 I	62.6 ++	1.4 NC	49.1 +	103.4 ++	2.6 I	102.1 ++	2.6 I						
Hs.94234	frizzled (Drosophila) homolog 1	FZD1	32.8 -	63.0 +	2.0 I	43.1 +	1.5 NC	54.4 +	79.3 +	1.6 I	63.5 +	1.1 NC						
Hs.173859	frizzled (Drosophila) homolog 7	FZD7	59.9 +	170.1 ++	2.1 I	152.7 ++	1.9 I	70.6 ++	57.9 ++	1.1 NC	57.8 +	-1.1 NC						
Hs.126453	Secreted frizzled-related protein 3	SFRP3	50.6 +	119.0 ++	2.6 I	78.0 +	1.4 I	63.6 +	136.7 ++	2.6 I	72.8 ++	1.1 NC						
Hs.408355	Low density lipoprotein-related protein 11 (SorLA)	LRP11	150.7 ++	253.3 ++	1.2 NC	149.3 ++	-1.1 NC	221.6 ++	63.9 ++	2.5 I	386.8 ++	2.0 I						
Hs.2340	Junction plakophilin	JUP	621.0 ++	494.1 ++	-1.1 NC	588.9 ++	1.0 NC	624.6 ++	538.0 ++	-1.1 NC	149.3 ++	-3.5 D						
Hs.371468	Cyclin D1 (PRAD1, parathyroid adenomatosis 1)	CCND1	64.3 +	49.6 +	-1.3 NC	46.6 +	-1.2 NC	60.2 +	28.4 +	-1.6 NC	28.7 -	-2.3 D						
Hs.169294	Transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box)	TCF7	357.1 ++	245.2 ++	-2.0 D	363.7 ++	-1.2 NC	279.0 ++	210.0 ++	-1.2 NC	141.0 ++	-1.6 NC						
Hs.179657	Plasminogen activator, urokinase receptor	PLAUR	153.3 +	161.9 +	1.4 I	80.8 +	-1.6 NC	118.4 +	118.2 ++	1.2 NC	367.7 ++	2.5 I						
Hs.416769	itf-2	PPM1B	168.3 ++	327.1 ++	1.5 I	231.7 ++	1.1 NC	257.8 ++	508.4 ++	2.0 I	329.4 ++	1.2 I						
Hs.306278	CD44 antigen (Indian blood group system)	CD44	552.9 ++	485.0 ++	1.1 NC	657.3 ++	1.1 I	397.5 ++	548.0 ++	1.6 NC	709.8 ++	2.0 I						
Hs.173859	Frizzled homolog 7 (Drosophila)	FZD7	59.9 +	170.1 ++	2.1 I	152.7 ++	1.9 I	70.5 ++	57.9 ++	1.1 NC	57.8 +	-1.1 NC						
Hs.418138	Fibronectin 1	FN1	170.7 +	402.3 ++	2.3 I	213.3 +	1.0 NC	314.9 +	353.3 ++	1.6 MI	520.4 ++	1.6 I						
Hs.407830	V-mb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	MYB	176.7 ++	220.6 ++	1.1 NC	107.9 +	-1.9 D	378.4 ++	605.6 +	2.5 I	409.0 ++	1.0 NC						
Hs.292477	V-ets erythroleukemia virus E26 oncogene homolog 2	ETS2	231.7 ++	491.9 ++	2.0 I	313.6 ++	1.3 NC	227.6 ++	347.9 ++	1.2 NC	266.3 ++	-1.1 NC						
Hs.278562	claudin 7 (CLDN7)	CLDN7	1601.0 ++	1016.9 +	-1.6 D	1477.8 ++	-1.2 NC	1451.3 ++	1023.1 ++	-1.9 D	299.7 +	-4.9 D						
Hs.110299	MAP kinase kinase Jnk2	MAP2K7	296.5 ++	137.1 ++	-2.0 D	273.4 ++	-1.1 NC	336.1 ++	116.5 +	-2.5 D	80.6 -	-3.2 D						
Hs.37003	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS	50.3 ++	39.1 ++	-1.5 NC	66.4 ++	-1.1 NC	72.5 ++	33.7 +	-2.1 D	39.1 ++	-1.7 NC						
Hs.412107	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog	KRAS2	250.7 ++	401.2 ++	1.4 I	280.2 +	1.1 NC	274.8 ++	601.3 ++	2.0 I	493.1 ++	1.5 I						
Hs.443435	cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	CDH11	79.3 +	106.7 ++	1.4 I	94.3 ++	1.3 I	75.6 ++	156.1 ++	2.3 I	189.1 ++	2.8 I						
Hs.170333	SWI/SNF related, regulator of chromatin, f1	SMARCF1	195.8 ++	164.0 ++	-1.5 NC	297.9 ++	1.1 NC	207.0 ++	96.6 ++	-2.3 D	188.2 ++	-1.5 NC						
Hs.368776	SWI/SNF related, regulator of chromatin, a5	SMARCA5	85.5 ++	135.9 ++	2.0 I	121.5 ++	1.4 NC	99.2 +	213.2 ++	1.9 I	108.5 ++	1.2 NC						
Hs.159971	SMARCB1 actin dependent regulator of chromatin	SMARCB1	180.1 ++	72.4 +	-2.3 D	176.7 ++	-1.1 NC	177.0 ++	1023.1 ++	-1.9 D	129.1 ++	-1.9 NC						
Hs.359289	transcription factor 4	TCF4	228.7 ++	247.8 ++	1.6 NC	247.7 ++	1.5 I	209.1 +	407.2 ++	2.8 I	119.3 ++	1.1 NC						
Hs.169294	transcription factor 7	TCF7	357.1 ++	245.2 ++	-2.0 D	363.7 ++	-1.2 NC	279.0 ++	210.0 ++	-1.2 NC	141.0 ++	-1.6 NC						
Hs.232068	transcription factor 8	TCF8	46.1 ++	76.5 ++	1.9 NC	57.0 ++	-1.1 NC	35.5 +	130.8 ++	2.1 I	76.5 ++	1.6 MI						
Hs.387667	peroxisome proliferator activated receptor, gamma	PPARG	116.7 ++	43.5 +	-2.8 D	48.5 ++	-2.1 D	142.8 ++	121.6 ++	-1.1 NC	227.9 ++	1.6 NC						
Hs.173902	protein phosphatase 2, regulatory subunit (PR 65), alpha	PPP2R1A	253.3 ++	148.9 +	-1.7 NC	211.3 ++	-1.2 NC	263.2 ++	154.1 +	-1.5 D	191.1 -	-7.5 D						
Hs.118244	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56)	PPP2R5D	75.7 ++	33.3 ++	-1.9 D	73.8 ++	1.0 NC	54.8 +	30.2 ++	-1.4 D	17.1 +	-2.5 D						
Hs.173328	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon	PPP2R5E	540.6 ++	699.5 ++	1.3 NC	436.6 ++	-1.3 NC	525.9 ++	978.7 ++	1.7 I	220.3 ++	-2.3 D						
Hs.295923	seven in absentia (Drosophila) homolog	SIAH1	207.5 ++	307.5 ++	1.6 I	206.3 ++	1.2 NC	155.7 ++	371.4 ++	3.5 I	212.8 ++	1.3 NC						
Hs.12271	f-box and leucine-rich repeat protein 6	FBXL6	107.3 ++	57.9 ++	-1.9 D	90.1 ++	-1.1 NC	95.4 +	35.3 +	-2.3 D	15.6 -	-4.3 D						
Hs.5548	F-box protein FLR1	FBXL5	156.5 ++	231.2 ++	2.1 I	227.9 ++	1.7 I	135.5 ++	256.0 ++	1.7 I	232.2 ++	1.5 I						
Hs.368950	MADS box transcription enhancer 2, polypeptide C	MEF2C	49.8 ++	64.0 ++	1.0 NC	76.8 ++	1.9 I	32.3 -	108.9 ++	2.1 I	98.9 ++	2.5 I						
Hs.381137	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	CRI1	8.1 ++	48.3 ++	2.3 I	42.2 ++	1.1 NC	44.9 ++	29.8 ++	1.7 NC	63.8 ++	2.0 I						
Hs.301266	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	TCOF1	30.4 +	12.3 +	-2.1 NC	20.7 +	-1.3 NC	28.6 +	10.1 +	-2.1 NC	11.6 -	-2.0 D						
Hs.367877	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A)	MMP2	266.7 ++	500.3 ++	1.5 NC	264.8 ++	-1.1 NC	220.3 ++	522.4 ++	1.5 NC	1050.4 ++	3.7 I						
Hs.374664	INHBC, TGF beta signalling	TGFBI	235.5 ++	630.2 ++	2.0 I	256.2 ++	1.0 NC	356.2 ++	555.8 +	1.5 NC	971.1 ++	2.5 I						
Hs.2534	bone morphogenetic protein receptor, type IA	BMPR1A	65.1 ++	135.1 ++	2.3 I	57.4 +	1.0 NC	60.6 +	142.8 ++	3.0 I	73.4 ++	1.2 NC						
Hs.79067	Smad1	MADH1	181.6 ++	178.0 ++	-1.1 NC	188.0 ++	-1.1 NC	197.2 ++	130.6 ++	1.0 NC	63.6 ++	-2.0 D						
Hs.82483	Smad2	MADH2	133.3 ++	245.8 ++	1.7 I	144.3 ++	1.1 NC	116.7 ++	253.7 ++	2.0 I	218.7 ++	1.5 I						
Hs.438968	Smurf2	SMURF2	83.7 ++	289.4 ++	3.2 I	123.9 ++	1.6 NC	53.8 +	217.4 ++	3.0 I	91.2 ++	1.4 I						
Hs.109727	imtogen-activated prot kinase kinase kinase 7 interact prot	TAB1	143.4 +	184.9 ++	1.2 I	135.3 ++	-1.1 NC	135.2 ++	151.9 ++	2.1 I	215.1 ++	1.5 I						
0 Notch																		
Hs.434872	Notch homolog 2 (Drosophila)	NOTCH2	236.4 ++	244.7 ++	1.1 NC	226.4 ++	-1.1 NC	171.0 ++	318.6 ++	2.0 I	285.6 ++	1.6 I						
Hs.128637	kelch-like 6 (Drosophila)	KLHL6	323.3 ++	79.2 ++	-3.2 D	284.2 ++	1.0 NC	110.4 +	142.8 ++	1.1 NC	220.1 ++	1.7 I						
Hs.310320	Mastermind-like 3 (Drosophila)	MAML3	105.5 +	100.8 +	-1.1 NC	143.3 +	1.0 NC	128.5 +	92.7 +	-1.1 NC	51.0 -	-2.0 D						
Hs.407755	ligand of numb-protein X	LNK	167.7 ++	435.0 ++	2.1 I	206.3 ++	1.2 NC	156.2 ++	384.7 ++	2.1 I	186.5 ++	1.1 NC						
Hs.283522	presenilin enhancer 2	PEN2	97.5 ++	66.3 ++	-1.3 NC	128.5 ++	1.1 I	133.5 ++	99.6 ++	-1.3 D	216.1 +	-5.7 D						
Hs.108408	likely ortholog of <i>C. elegans</i> anterior pharynx defective 1A	APH-1A	239.7 ++	238.8 ++	1.0 NC	180.1 ++	-1.1 NC	267.4 ++	301.7 ++	1.1 NC	114.3 ++	-2.8 D						
Hs.410347	positive cofactor 2 glutamine O-rich-associated protein	PCQAP	92.8 ++	64.1 ++	-1.7 D	118.8 ++	1.1 NC	99.5 ++	60.6 +	-2.0 D	31.2 -	-4.0 D						
0 Hedgehog																		
Hs.115274	IIHH Indian hedgehog homolog (Drosophila)	IIHH	414.3 ++	172.9 ++	-2.0 D	291.7 ++	-1.4 NC	876.8 ++	241.4 +	-2.6 D	115.4 -	-3.5 D						
Hs.381137	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	CRI1	8.1 ++	48.3 ++	2.3 I	42.2 ++	1.1 NC	44.9 ++	29.8 ++	1.7 NC	63.8 ++	2.0 I						
Hs.2534	Bone morphogenetic protein receptor, type IA	BMPR1A	65.1 ++	135.1 ++	2.3 I	57.4 +	1.0 NC	60.6 +	142.8 ++	3.0 I	73.4 ++	1.2 NC						
Hs.388294	mothers against decapentaplegic homolog 1 (Drosophila)	MADH1	289.1 ++	400.0 ++	1.2 NC	273.3 ++	-1.1 NC	318.2 ++	624.3 ++	1.9 I	322.8 ++	1.1 NC						
Hs.110741	mothers against decapentaplegic homolog 2 (Drosophila)	MADH2	133.3 ++	245.8 ++	1.7 I	144.3 ++	1.1 NC	116.7 ++	253.7 ++	2.0 I	218.7 ++	1.5 I						
Hs.123119	mothers against decapentaplegic homolog 9 (Drosophila)	MADH9	113.1 ++	120.5 ++	1.1 NC	131.3 ++	-1.1 NC	129.3 ++	321.9 ++	2.5 I	210.9 ++	1.3 NC						
Hs.408355	Low density lipoprotein-related protein 11 (SorLA)	LRP11	150.7 ++	253.3 ++	1.2 NC	149.3 ++	-1.1 NC	221.6 ++	563.9 ++	2.5 I	386.8 ++	2.0 I						
0 HNF1alpha (TCF1) targets																		
Hs.435783	glucose-6-phosphatase, catalytic (von Gierke disease)	G6PC	73.2 +	165.3 ++	2.3 I	131.2 ++	1.7 I	35.4 +	17.6 +	-1.6 MD	4.6 -	-5.3 D						
Hs.75812	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PCK2	719.9 ++	861.2 ++	1.1 NC	921.3 ++	1.1 NC	605.5 ++	261.6 ++	-2.8 D	275.2 ++	-2.8 D						
Hs.429596	sucrease-isomaltase	SI	1312.6 ++	1665.6 ++	1.3 NC	1545.2 ++	1.1 NC	962.5 ++	1313.6 ++	1.4 NC	465.4 ++	-2.0 D						
Hs.194783	solute carrier family 10A2 (sodium/bile acid cotransporter)	SLC10A2	726.7 ++	1335.7 ++	1.5 I	1081.3 ++	1.3 I	362.4 ++	274.5 ++	-1.6 NC								

Neben dem Expressionssignal sind weiterhin der *detection p-value* und bei den Patientenkollektiven zusätzlich der *fold change* der Genexpression sowie der *change call*, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, angegeben. FC, *fold change*; Sig, Expressionssignal; p, *detection p-value*, Ch, *change call*

4.4 Verminderte Mucinexpression im Ileum und Colon bei CED

Mit der im vorherigen Kapitel beschrieben Pathway bezogenen Analyse der DNA-Microarray Daten, konnte eine umfangreiche differentielle Regulation der an der Schutz- und Barrierefunktion im Darm beteiligten Gene gefunden werden. Besonders auffällig dabei war eine in allen vier untersuchten Bedingungen hohe Zahl an vermindert exprimierten Mucinen, den Hauptkomponenten der extrazellulären Mukus Schicht. Deswegen wurden die DNA-Microarray Ergebnisse der einzelnen Mitglieder der Mucin Genfamilie im Detail analysiert (Tabelle 7).

Tabelle 7 Expression und differentielle Regulation von Mucin Genen bei CED

Bei nicht exprimierten Mucinen erfolgte keine *fold change* und *change call* Berechnung. FC, *fold change*; Sig, Expressionssignal; p, *detection p-value*, Ch, *change call* (Details siehe Tabelle 6)

Von den aktuell bekannten 21 humanen Mucinen waren 19 (außer MUC10 und MUC19) auf den verwendeten Affymetrix DNA-Microarrays mit spezifischen Sonden repräsentiert. Bislang ist MUC10 nur in Nagern näher charakterisiert und es existiert kein humanes Orthologes. Die MUC19 Expression beschränkt sich auf Schleim produzierende Zellen verschiedener Drüsengewebe, wie Submandibular- und Sublingualdrüse [70]. MUC3A, MUC6, MUC7, MUC8, MUC9, MUC11, MUC15 und MUC16 wurden von der Affymetrix Software als nicht exprimiert gewertet. Die höchsten Expressionswerte zeigten MUC2, MUC13 und MUC17 jeweils in beiden gesunden Geweben und MUC12 im gesunden Colon. Bei allen detektierten Expressionsunterschieden der Mucine bei CED handelte es sich um eine Verminderung der mRNA Level und zwar um den Faktor –1,3 bis –48,5. Die sehr hohen *fold change* Werte in den Regulationen von MUC12 und MUC4 im Ileum und MUC5AC sowie MUC5B in beiden Geweben erklären sich aus dem niedrigen Expressionssignal des jeweiligen CED Gewebes, was auf einen vollständigen Verlust der Transkription hindeutet. In den folgenden Experimenten wurden jeweils die im intestinalen Gewebe exprimierten Mucine MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC12, MUC13, MUC17 und MUC20 untersucht.

4.5 Gewebespezifische mRNA Expression der Mucin Gene

Um einen Überblick über die gewebespezifische Verteilung der Mucine zu erhalten, wurden real-time RT-PCR Assays dieser Gene etabliert und anschließend die Expressionsprofile in 26 verschiedenen Geweben ermittelt (Tabelle 8). Generell konnte eine auf epitheliale Gewebe, wie Luftröhre, fötale Lunge, Magen sowie Dünnd- und Dickdarm, beschränkte Mucin Expression gefunden werden, was mit der bereits beschriebenen Schutzfunktion der Mucine in epithelialen Geweben übereinstimmt. Außer MUC5AC, welches als Hauptvertreter in den Epithelgeweben der Atemwege gilt [71], sind alle untersuchten Mucine sehr stark in den intestinalen Geweben exprimiert. Die jeweils niedrigere Expression von MUC4, MUC5B, MUC12 und MUC20 im Ileum verglichen mit der im Colon, sowie der umgekehrte Fall für MUC17, decken sich mit dem DNA-Microarray Ergebnissen.

Tabelle 8 Gewebespezifische Expression von Mucin Genen

	MUC1	MUC2	MUC4	MUC5AC	MUC5B	MUC12	MUC13	MUC17	MUC20
fötale Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gehirn	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rückenmark	•	-	•	-	-	-	-	-	-
Skelettmuskel	-	•	-	-	-	-	-	-	-
Schilddrüse	•	-	-	-	••	-	-	-	•••
Nebenniere	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Knochenmark	•	-	-	-	-	-	-	-	-
Thymus	•	-	•	-	-	-	-	-	••
Milz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoden	••	•	••	-	-	•	-	-	-
Prostata	••••	•	••	-	-	•••	•	•	••••
Brustdrüse	••••	-	••	-	••	-	-	-	••••
Plazenta	•••	-	-	-	-	-	-	-	•••
Gebärmutter	••	-	-	-	••	-	-	•	••
Herz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niere	•••	-	-	-	-	-	•••	-	••••
fötale Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bauchspeicheldrüse	•••	-	-	-	•	-	••	-	••
Speicheldrüse	••	-	•	-	•••	-	-	-	••
Luftröhre	••••	••	••••	••••	••••	-	•••	-	••••
fötale Lunge	••••	•••	••••	•	••••	••	••••	•	••••
Lunge	••••	-	••	•••	••	-	-	-	•••
Magen	••	••	••	••••	••	•	•••	•••	•••
Dünndarm	••••	••••	-	-	-	•	•••	••••	•••
Dickdarm	••••	••••	••••	-	••••	••••	••••	•••	••••

Sehr hohe Expressionswerte in Geweben sind gelb hervorgehoben. - = nicht exprimiert, • = niedrig exprimiert, •• = mittel exprimiert, ••• = hoch exprimiert, •••• = sehr hoch exprimiert

4.6 Verifizierung der differentiellen Mucin Expression in CED

Ausgehend vom erfolgreichen Aufbau eines quantitativen Verfahren zur mRNA Analytik für alle Mitglieder der humanen ABC-Transporterfamilie [72], wurde zur Validierung der DNA-Microarray Ergebnisse die quantitative real-time RT-PCR verwendet. Dazu wurde versucht die differentiellen Mucin Regulationen in 6 bis 14 unabhängigen Einzelbiopsien zu bestätigen (Details siehe Kapitel 3.1.6.2 Biopsien). Wie in Abb. 7 dargestellt, zeigten die Expressionswerte für MUC1 starke interindividuelle Schwankungen, was die Auswertung limitiert. Die Herabregulation von MUC2 konnte im Colon bestätigt werden, wobei sie bei Morbus Crohn statistisch signifikant war. Aufgrund der niedrigen DNA-Microarray Signalwerte von MUC4 und MUC5AB in den Kontrollgeweben ergab sich, wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, ein hoher *fold change* Wert. Die verminderte Expression dieser beiden Mucine bei CED konnte trotzdem, wenn auch nicht in diesem Ausmaß, wiedergefunden werden. MUC12 zeigte

eine statistisch signifikante erniedrigte mRNA Menge im Colon bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, während die Expression im Ileum nahezu unverändert war. Weiterhin bestätigten sich die Regulationen von MUC13 und MUC17, mit der Ausnahme des Colons bei Colitis ulcerosa, wo sich die erhöhten Transkriptionslevel beider Gene als statistisch signifikant erwiesen. Bei MUC20 konnte mit der real-time RT-PCR keine differentielle Regulation bei CED nachgewiesen werden. Somit ließ sich mit der real-time RT-PCR die Verminderung der Mucin Expression tendenziell bestätigen, allerdings ergab sich aufgrund der teilweise sehr starken interindividuellen Schwankungen, kein so klares Bild wie bei den DNA-Microrray Analysen mit gepoolten RNAs.

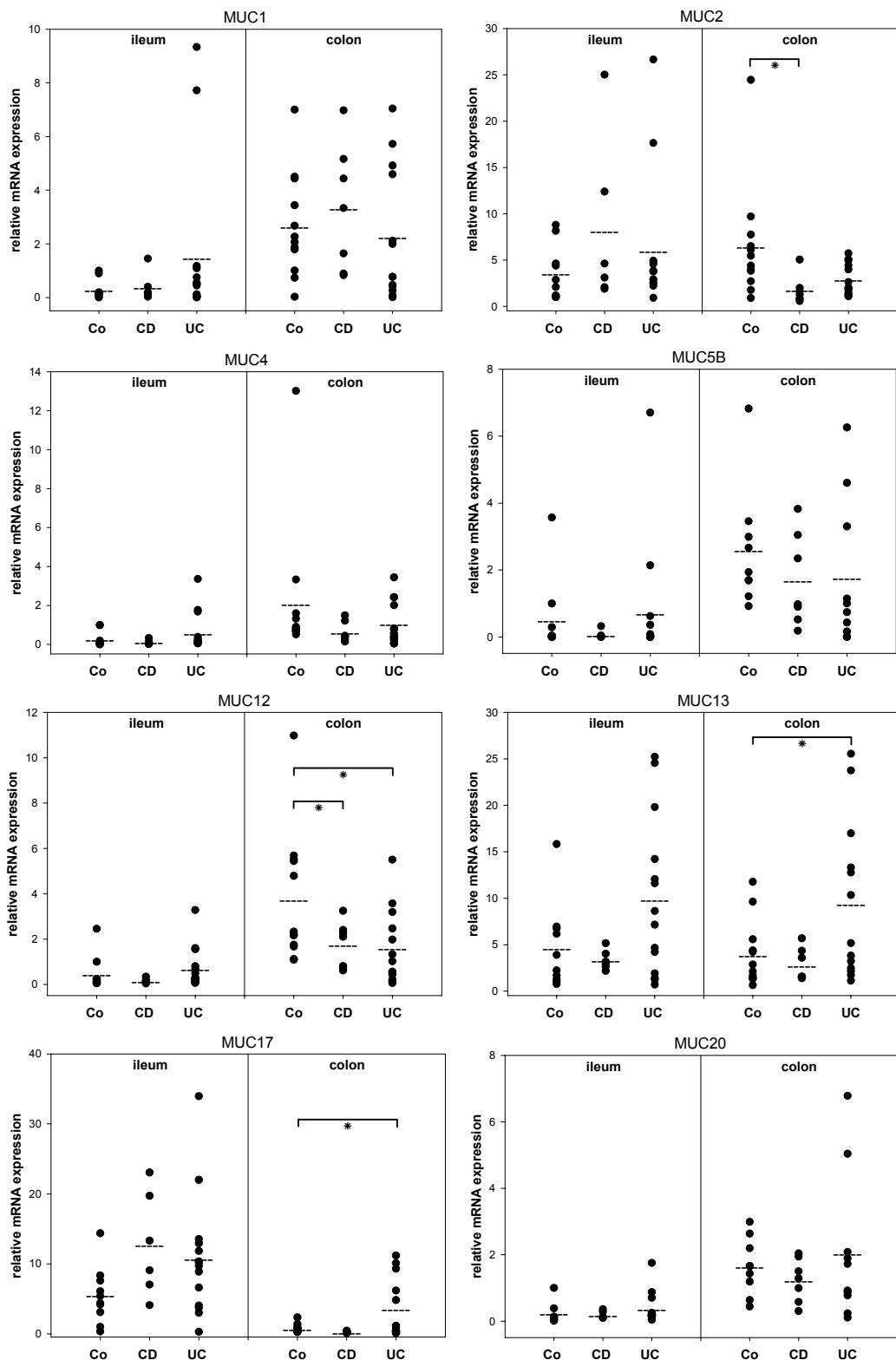
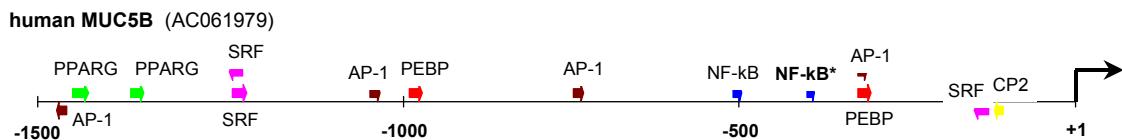


Abb. 7 Bestätigung der differentielle Regulation von Mucin Genen bei CED mittels real-time RT-PCR Expressionsanalysen in individuellen Ileum- sowie Colon Biopsien von MC-, CU- und Kontroll Probanden. Jede Messung wurde zwei Mal wiederholt. Die Expression von 18S ribosomaler RNA diente als interne Kontrolle. Die horizontalen Linien stellen die durchschnittliche Expression innerhalb einer Gruppe dar. P-Werte kleiner 0,05 sind mit einem Stern markiert. Co, Kontrolle; CD, Morbus Crohn; UC, Colitis ulcerosa

4.7 Promotoranalyse und transkriptionelle Regulation der Mucin Gene

Die geclusterte Anordnung von Mucinen in verschiedenen Bereichen des Genoms und deren koordinierte Herabregulation bei CED sowohl im DNA-Microarray, als auch beim real-time RT-PCR Ergebnis, legt eine gemeinsame transkriptionelle Regulation nahe. Um diese Mechanismen aufzuklären, wurden die Transkriptionsstartpunkte aller Mucine mit den DBTSS (Database of Transcription Start Sites, http://elmo.ims.u_tkyo.ac.jp/dbtss) und NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Datenbanken ermittelt. Zusätzlich wurden die zugehörigen Maus Promotoren identifiziert und ein Homologieabgleich mit der *clustalw* software (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) durchgeführt, um mittels eines phylogenetischen *footprintings* evolutionär konservierte Promotorbereiche zu bestimmen. Es wurden jeweils 1500bp umfassende, *upstream* des Transkriptionsstartpunktes gelegene, Promotorsequenzen mit den Programmen MatchTM und Composite Modules FinderTM (<http://www.biobase.de>) auf putative DNA Bindestellen für Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei wurde auf eine umfangreiche Bibliothek von sogenannten *mononucleotide weight matrices* zurückgegriffen, um die Vorkommenswahrscheinlichkeit von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu berechnen. Interessanterweise wurde mittels MatchTM im Promotor aller untersuchten Mucinen eine NFκB Bindestelle gefunden, was für MUC2, MUC4 und MUC5B bereits experimentell bestätigt werden konnte [73][74]. Exemplarisch ist das Ergebnis für MUC5B in Abb. 8 dargestellt.

A)



B)

Abb. 8 Match™ Analyse von 1500bp umfassenden humanen und Maus Mucin Promotorbereichen am Beispiel von MUC5B. A) Darstellung aller identifizierten potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen im humanen MUC5B Promotor. Die experimentell bewiesene NFκB Bindestelle ist mit einem Stern markiert. B) Ausschnitt aus dem Promotoralignment zwischen humanen und Maus MUC5B, der die experimentell bewiesene NFκB Bindestelle (gelb hinterlegt) enthält.

Mittels weiter Algorithmen konnten neben NF κ B 28 weitere Transkriptionsfaktor Matrices gefunden werden, deren Bindestellen in den Mucin Promotoren im Vergleich zu Promotoren von bei CED nicht regulierten Genen, überrepräsentiert sind (Tabelle 9A). Da eine Matrix mehr als einen Transkriptionsfaktor beinhalten kann, wurden sämtliche Mitglieder der einzelnen Matrices identifiziert und deren Regulation in den DNA-Microarray Daten bestimmt. 17 Transkriptionsfaktoren, darunter wiederum NFKB1, waren bei CED differentiell reguliert (Tabelle 9B), was ein zusätzliche Bestätigung für deren Beteiligung an der Expressionsregulation bei CED darstellt.

Tabelle 9 Analyse von potentiellen und experimentell bewiesenen cis-regulatorischen Elementen in der Mucin Promotorsequenz

A)

core cut-off	matrix cut-off	Matrix ID	Freq. Ratio	Freq. Mucin	Freq.NC	p-value	Gene symbols
0,701	0,981	V\$LFA1_Q6	4,8715	1,5000	0,3079	1,29E-07	LFA1
0,768	0,835	V\$USF_01	1,7113	7,0000	4,0904	4,60E-06	USF1
0,810	0,940	V\$HAND1E47_01	3,5363	1,5833	0,4477	5,30E-06	TCF3
0,791	0,934	V\$SMAD_Q6_01	1,8760	5,0000	2,6653	7,85E-06	SMAD1 to 7
0,800	0,931	V\$AML1_01	1,7855	5,7500	3,2203	8,42E-06	RUNX1
0,694	0,978	V\$MYCMAX_B	12,6426	0,5000	0,0395	1,93E-05	MAX,MYC
0,766	0,857	V\$PEBP_Q6	2,1151	3,1667	1,4972	3,14E-05	CBFB,RUNX1 to 3
0,827	0,874	V\$MEIS1_01	1,5540	7,4167	4,7726	7,27E-05	MEIS1
0,813	0,921	V\$LMO2COM_01	1,6340	5,4167	3,3150	1,73E-04	LMO2
0,769	0,860	V\$COREBF_Q6	1,6901	4,5833	2,7119	2,37E-04	AML
0,714	0,867	V\$GRE_C	5,9000	0,5833	0,0989	3,10E-04	NR3C1
0,746	0,824	V\$MYOD_01	1,4750	7,3333	4,9718	3,99E-04	MEF1
0,800	0,834	V\$ARNT_02	1,9626	2,6667	1,3588	4,36E-04	ARNT,AHR
0,658	0,829	V\$HEN1_01	2,8881	1,1667	0,4040	6,13E-04	HEN1
0,651	0,822	V\$SRF_Q5_01	2,1520	2,0000	0,9294	6,44E-04	SRF
0,658	0,872	V\$NFKAPPAB_01	2,1071	2,0833	0,9887	6,72E-04	RELA,NFKB1
0,778	0,894	V\$OSF2_Q6	1,6605	4,0833	2,4590	7,12E-04	RUNX2
0,787	0,968	V\$AP1FJ_Q2	2,1747	1,9167	0,8814	7,19E-04	FOS,JUN
0,776	0,955	V\$CRX_Q4	2,1643	1,9167	0,8856	7,65E-04	RAX,CRX
0,800	0,843	V\$MEF3_B	3,1189	1,0000	0,3206	7,78E-04	MEF3
0,675	0,913	V\$CP2_01	2,8943	1,0833	0,3743	9,26E-04	LSF
0,778	0,946	V\$AP4_Q6	2,2086	1,7500	0,7924	9,92E-04	TFAP4
0,782	0,996	V\$YY1_01	58,9795	0,1667	0,0028	1,63E-03	YY1
0,671	0,945	V\$STAT1_01	58,9795	0,1667	0,0028	1,63E-03	STAT1
0,708	0,993	V\$BACH2_01	29,4950	0,1667	0,0057	3,98E-03	BACH2
0,800	0,963	V\$HNF4_01_B	19,6645	0,1667	0,0085	7,28E-03	HNF4A,NR2F1
0,800	0,962	V\$SREBP1_02	19,6645	0,1667	0,0085	7,28E-03	SREBF1
0,765	0,889	V\$PAX5_01	10,4114	0,2500	0,0240	4,27E-03	PAX5

B)

Gene Symbol	UniGene ID	Control ileum Sig	Control ileum p	Crohn ileum Sig	Crohn ileum p	Crohn ileum Fc	Crohn ileum Ch	Colitis ileum Sig	Colitis ileum p	Colitis ileum Fc	Colitis ileum Ch	Control colon Sig	Control colon p	Control colon Fc	Control colon Ch	Colitis colon Sig	Colitis colon p	Colitis colon Fc	Colitis colon Ch		
SMAD1	Hs.357304	289,1	++	400	++	1,2	NC	273,1	++	-1,1	NC	318	++	624,3	++	1,9		322,8	++	1,1	NC
SMAD2	Hs.12253	133,3	++	245,8	++	1,7	I	144,3	++	1,1	NC	117	++	253,7	++	2,0	I	218,7	++	1,5	I
SMAD7	Hs.370849	145,3	++	243,5	++	1,2	NC	216,0	++	1,3	I	149	++	175,7	+	-1,4	NC	166,6	++	-1,3	NC
MAX	Hs.42712	514,9	++	695,4	++	1,6	I	569,4	++	1,3	I	295	++	569,2	++	1,7	I	387,7	++	1,1	NC
RUNX2	Hs.122116	259,9	++	264,4	++	-1,1	NC	243,1	++	1,0	NC	217	++	360,4	++	1,9	I	285,4	++	1,5	I
RUNX3	Hs.170019	182,8	++	87	++	-1,6	D	198,5	++	1,2	NC	104	++	92,3	++	1,4	NC	111,4	++	1,9	I
LMO2	Hs.283063	98,2	+	108,3	+	1,0	NC	110,2	+	1,0	NC	82	+	91,4	+	1,1	NC	125,4	+	1,2	I
NR3C1	Hs.126608	242,6	++	295,9	++	1,3	I	302,3	++	1,4	I	150	++	164,4	++	1,0	NC	243,4	++	1,4	I
AHR	Hs.170087	47,9	++	70,4	++	1,6	NC	94,3	++	1,5	NC	41	+	71,6	++	1,9	I	53,1	+	2,8	NC
NFKB1	Hs.431926	208,0	++	170,1	++	-1,5	NC	229,0	++	1,0	NC	186	++	93,9	+	-1,9	D	200	++	1,0	NC
RUNX2	Hs.122116	259,9	++	264,4	++	-1,1	NC	243,1	++	1,0	NC	217	++	360,4	++	1,9	I	285,4	++	1,5	I
FOS	Hs.25647	79,5	-	90,4	+	1,3	I	106,2	+	1,1	NC	84	-	383,8	++	3,2	I	129,7	+	1,4	I
JUN	Hs.78465	35,9	+	82,7	++	1,6	I	41,9	++	-1,4	NC	20	-	83,3	++	3,5	I	30,6	++	1,9	I
YY1	Hs.388927	1395,5	++	1628,4	++	1,2	NC	1286,1	++	1,0	NC	1281	++	2153,2	++	1,6	I	1562,8	++	1,3	NC
STAT1	Hs.21486	776,5	++	1069,9	++	1,3	I	842,9	++	1,0	NC	744	++	1553	++	1,7	I	1592,6	++	1,9	I
BACH2	Hs.88414	65,6	+	30,2	++	-2,0	D	66,9	++	1,1	NC	33	+	41,3	++	1,1	NC	29,3	+	-1,3	NC
SREBF1	Hs.190284	127,7	+	161	+	1,1	NC	80,9	++	-1,1	NC	127	+	80,8	-	-2,1	D	53,8	-	-2,8	D

A) Nach aufsteigenden P-Wert geordnete Auflistung von Transkriptionsfaktor Matrizes deren Transkriptionsfaktorbindestellen in Mucin Promotoren im Vergleich zu Promotoren von bei CED nicht regulierten Genen überrepräsentiert sind B) Expression und differentielle Regulation der in Mucin Promotoren bei CED über-repräsentierten Transkriptionsfaktoren (Details siehe Tabelle 6). *Freq. Mucin*, Frequenzen der Bindestellen in Mucin Promotoren; *Freq. NC*, Frequenzen der Bindestellen in Promotoren bei CED nicht regulierter Gene; *Freq. Ratio*, Verhältnis der Frequenzen; *p-value*, Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Frequenz-Unterschieds

Um eine Kombination an Transkriptionsfaktoren zu finden, die eine maximale Unterscheidung der Mucin Promotoren von Promotoren bei CED nicht differentiell regulierter Gene ermöglicht, wurden Mucin Promotoren mit dem Composite Modules Finder™ Programm (<http://www.biobase.de>) analysiert. Das berechnete, aus den acht Transkriptionsfaktor Matrices V\$PEBP_Q6; V\$PPARG_03; V\$SRF_Q5_01; V\$NFKAPPAB50_01; V\$STAT_01; V\$AP1_Q2; V\$CP2_01 und V\$HNF4_01_B bestehende, *composite* Modul ermöglicht eine klare Unterscheidung von Mucin Promotoren mit einem Durchschnitts *composite* Wert von 10,3 von bei CED nicht regulierten Genen mit einem Durchschnitts *composite* Wert von 7,1 (Abb. 9). Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Promotoren weiterer Gene dieses *composite* Modul beinhaltet. Dazu wurden 1500bp umfassende, *upstream* des Transkriptionsstartpunktes gelegene Promotorbereiche aller 154555 in der TRANSPRO Datenbank vorhandenen humanen Gene auf Vorhandensein dieses Moduls überprüft. Da der *composite* Wert der Mucin Promotoren in der anfänglichen Berechnung 8,8 nicht unterschritt, wurde dieser Wert als Schwellenwert festgelegt. Unter den verbliebenen 3678 Genen, auf die diese Bedingung zutraf, waren zahlreiche Gene, die an der Bildung und Prozessierung der beiden den Mukus umgebenden Phosphatidylcholin (PC) und Lysophosphatidylcholin (LPC) Lagen beteiligt sind. Unter anderem handelt es sich dabei um *CDP-diacylglycerol synthase 1*, *1-acylglycerol-3-phosphate, O-acyltransferase 2*, *phospholipase A2 group III*, *diacylglycerol kinase theta 110kDa* und *phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase A*. Zusätzlich konnten weitere von der Mukosa sezernierte, protektive Gene, wie *trefoil factor Proteine (trefoil factor 1, trefoil factor 2)*, Defensine (*defensin alpha 1, defensin alpha 4*) und sekretorische dimere Immunglobuline (*polymeric immunoglobulin receptor*) identifiziert werden.

A)

Impact	core cut-off	matrix cut-off	Matrix Acc	Matrix ID
1,633264	0,820	0,846	M00984	V\$PEBP_Q6
0,227266	0,655	0,710	M00528	V\$PPARG_03
1,029221	0,651	0,774	M00922	V\$SRF_Q5_01
0,315389	0,701	0,840	M00051	V\$NFKAPPAB50_01
1,357934	0,933	0,964	M00223	V\$STAT_01
0,774543	0,962	0,921	M00173	V\$AP1_Q2
0,771532	0,675	0,892	M00072	V\$CP2_01
0,719151	1,000	0,901	M00411	V\$HNF4_01_B

B)

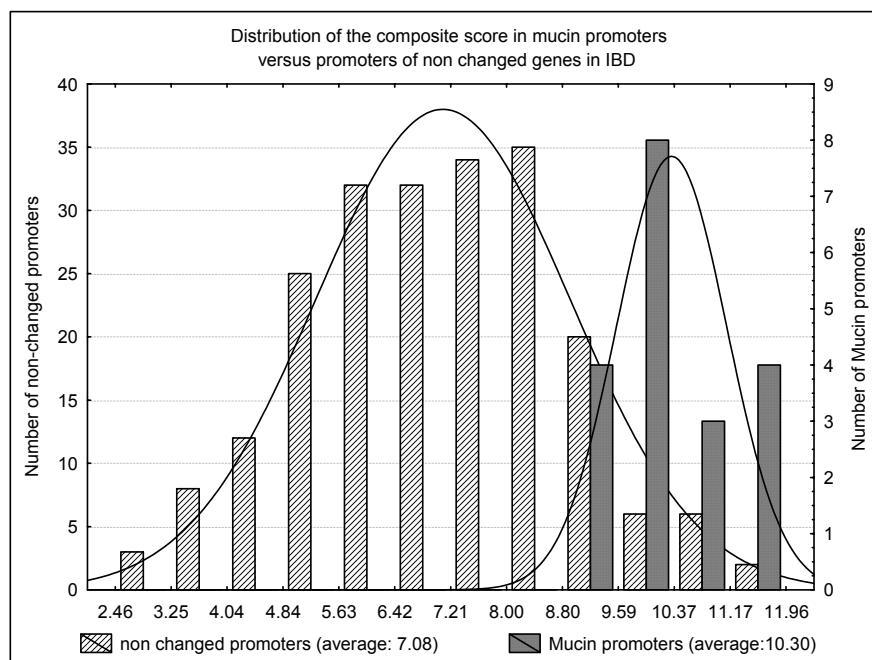


Abb. 9 Composite Module FinderTM Analyse von Mucin Promotoren. A) Berechnetes composite Modul, welches aus den acht aufgeführten Transkriptionsfaktor Matrices besteht. B) Verteilung der composite score Werte von Mucin Promotoren und Promotoren von bei CED nicht regulierten Genen.

4.8 Effekt von NF κ B Induktoren und Inhibitoren auf die Mucin Expression in intestinalen Zelllinien

Die Ergebnisse der virtuellen Promotoranalyse lassen eine Schlüsselrolle für NF κ B in der transkriptionellen Regulation der Mucin Gene vermuten. Darüber hinaus konnte bereits ein Polymorphismus im NF κ B Promotor mit Colitis

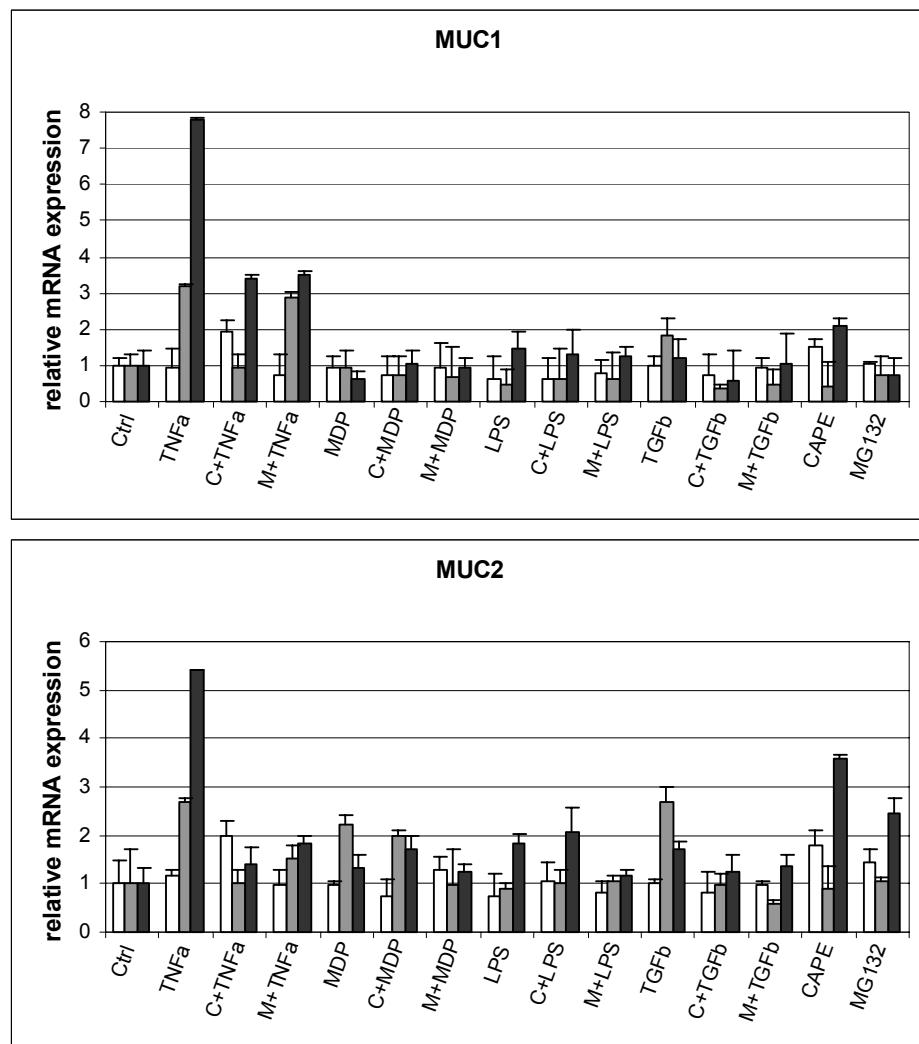
ulcerosa assoziiert werden [75]. Um zu untersuchen, ob die Mucin Expression tatsächlich über den NF κ B Pathway reguliert wird, wurden bakterielle- und Entzündungsmodelle verwendet. Dazu wurde die Mucin produzierende, intestinale Zelllinie LS174T mit verschiedenen NF κ B aktivierenden und inhibierenden Agentien stimuliert und die mRNA Level der intestinalen Mucine MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC12, MUC13, MUC17 und MUC20 in einem Zeitverlauf mittels real-time RT-PCR bestimmt. Dabei handelte es sich jeweils um eine Kurzzeit (1 Stunde), Mittelzeit (4 Stunden) und Langzeit (24 Stunden) Inkubation (Abb. 10).

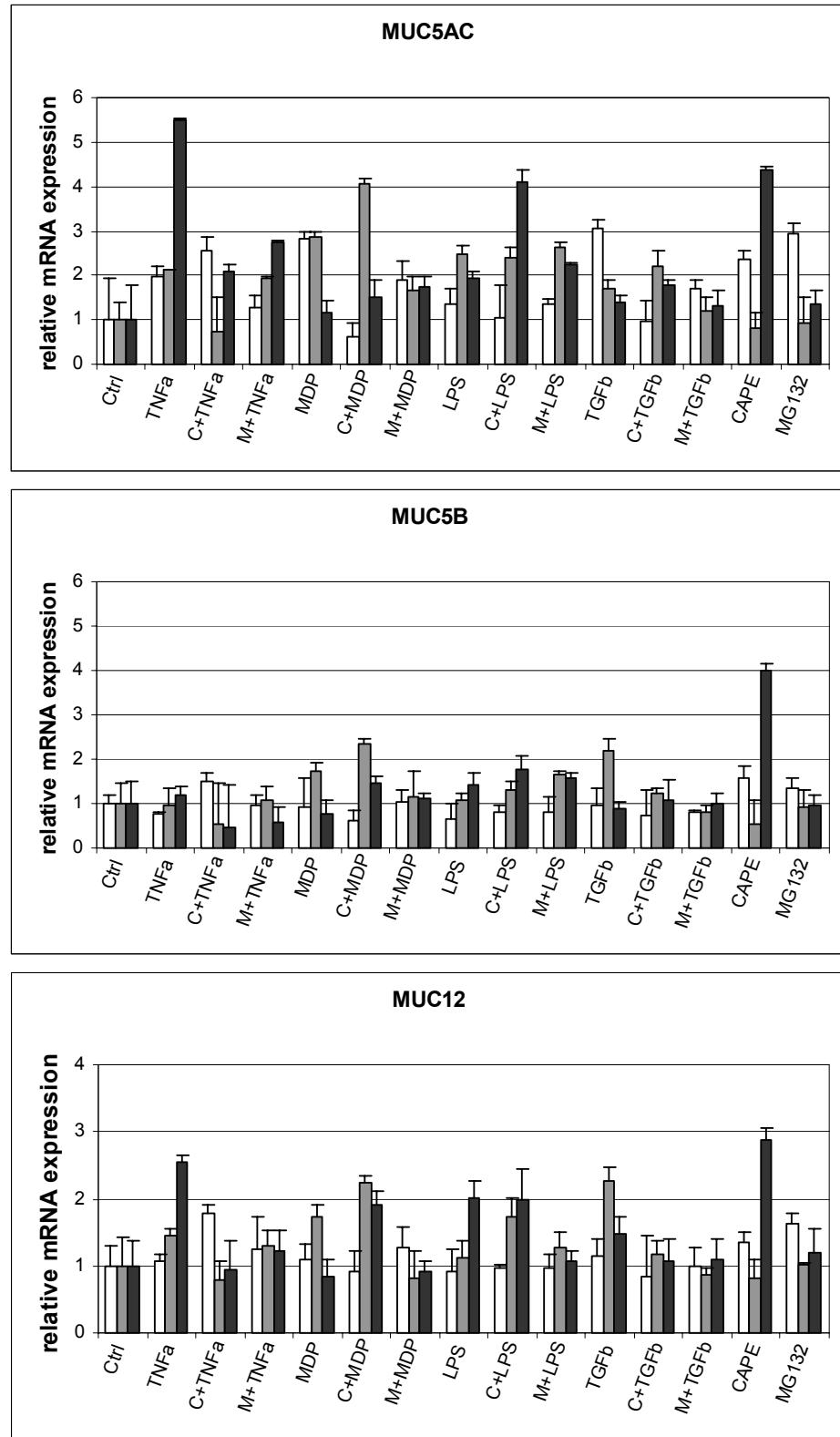
Das inflammatorische Zytokin TNF α bewirkte eine zeitverlaufsabhängige Hochregulation aller untersuchten Mucine. Koinkubation mit den beiden bekannten Nf κ B Hemmern *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE), welcher spezifisch die Translokation des p65 Proteins blockiert, ohne dabei die I κ B α Degradation zu beeinflussen [76] sowie dem Tripeptid *Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal* (MG132), einem Proteasom Inhibitor, welcher den Abbau von I κ B α verhindert [77], verminderte deutlich die Mucin Expression. Den stärksten Effekt zeigte MG132 bereits nach 1 Stunde, während dieser bei CAPE erst nach 4 Stunden auftrat.

Bei den bakteriellen Komponenten *N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamin Hydrat* (MDP) oder *Peptidoglycan* aus *Staphylococcus aureus* (LPS) handelt es sich um bekannte Aktivatoren des angeborenen Immunsystems. Nach der Bindung an *pattern recognition* Rezeptoren – wie Toll-like Rezeptoren (TLRs), *caspase recruitment domain* (CARD) *15/nucleotide oligomerization domain* (NOD) 2 und *scavenger* Rezeptoren – erfolgt die Transduktion über die *mitogen activated protein* (MAP) *kinase*- und NF κ B Signalkaskaden. MDP und LPS bewirkten eine schwache Hochregulation der gemessenen Mucine, welche durch Koinkubation mit CAPE und MG132 nicht beeinflusst wird.

Jono et al. beschrieb ein Zusammenwirken der NF κ B und TGF β Signalkaskaden um eine durch *nontypeable Haemophilus influenzae* verursachte Erhöhung der MUC2 Transkription zu vermitteln [78]. Um die potentielle Verbindung dieser beiden Pathways und die TGF β Sensitivität der Mucine zu

testen, wurden die LS174T Zellen mit TGF β inkubiert. Alle analysierten Mucine zeigten eine erhöhte Mucin Expression nach TGF β Behandlung, mit einem Maximum nach vier Stunden. Interessanterweise konnte die Induktion der Transkription sowohl durch CAPE als auch durch MG132 verhindert werden, was eine Verbindung der beiden Signalkaskaden bei der Mucin Regulation bestätigt. MUC4 war im verwendeten LS174T Zellmodell nicht exprimiert.





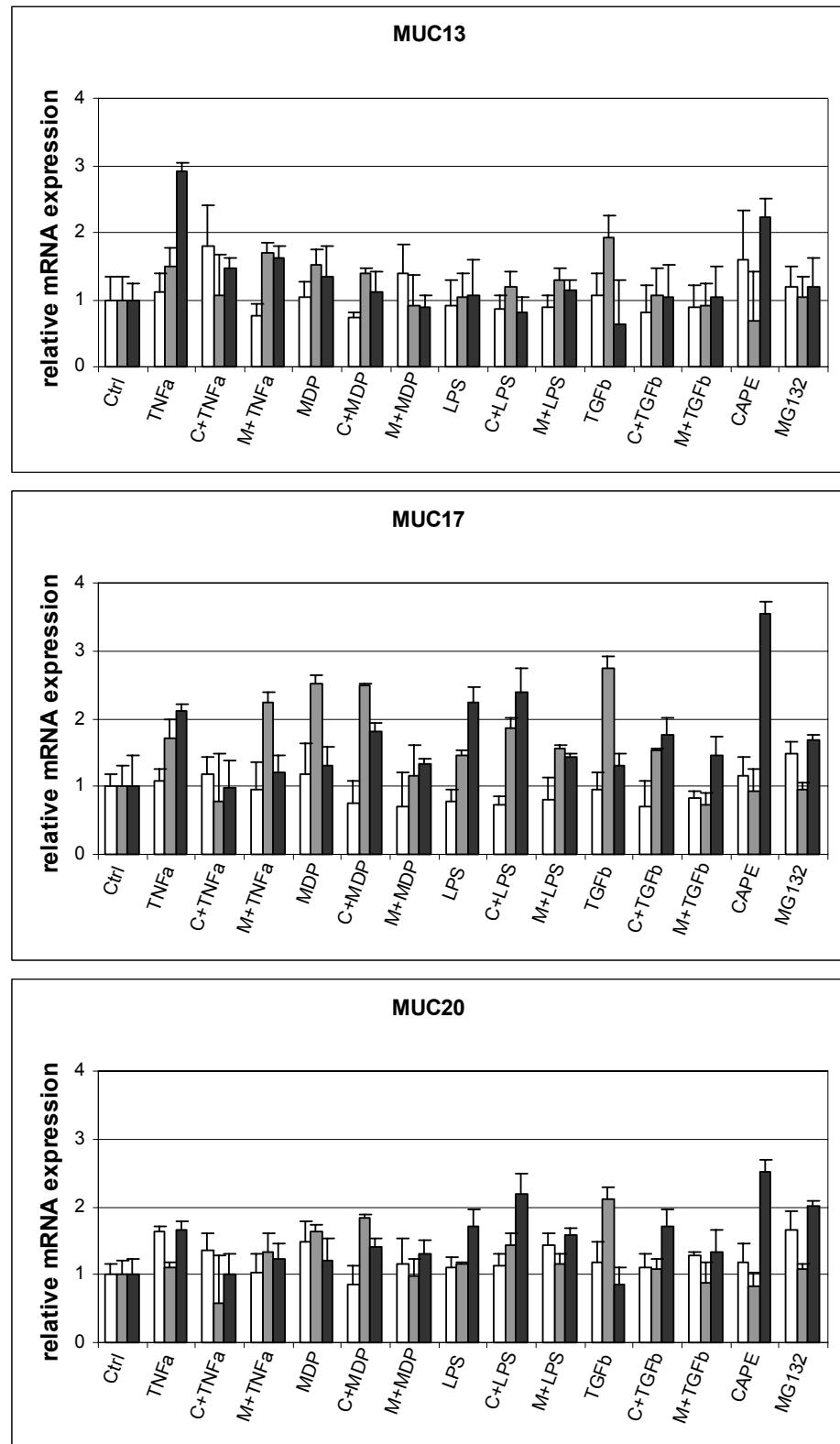


Abb. 10 Relative real-time RT-PCR Expressionsanalysen von Mucinen in LS174T Zellen nach Inkubation mit Zytokinen (TNF α , TGF β), bakteriellen Komponenten (MDP, LPS) und/oder NF κ B Inhibitoren (CAPE, C; MG132, M) für 1 (weiße Balken), 4 (graue Balken) und 24 (schwarze Balken) Stunden. Die Expression von 18S ribosomaler RNA diente als interne Kontrolle. Jedes Experiment wurde drei Mal und jede Messung zwei Mal wiederholt.

4.9 DNA-Mutationsanalyse von Mucin Genen und NOD2 in CED-Kollektiven und gesunden Blutspendern

Zusammen genommen legen die bisherigen Ergebnisse eine wichtige Rolle der Mucine in der Pathogenese von CED nahe. Außerdem konnten bereits veränderte *variable number of tandem repeats* (VNTR)- Bereiche in MUC3A mit Colitis ulcerosa und SNPs im C-Terminus von MUC3A mit Morbus Crohn assoziiert werden [61][79]. Somit könnten Mucine eine generelle Ursache für CED darstellen. Für diese Hypothese spricht zusätzlich eine 2004 durchgeföhrten Metaanalyse von 11 genomweiten CED *linkage* Studien, die insgesamt 38 Loci beschrieb [80] (Abb. 11 und Kapitel 4.10).

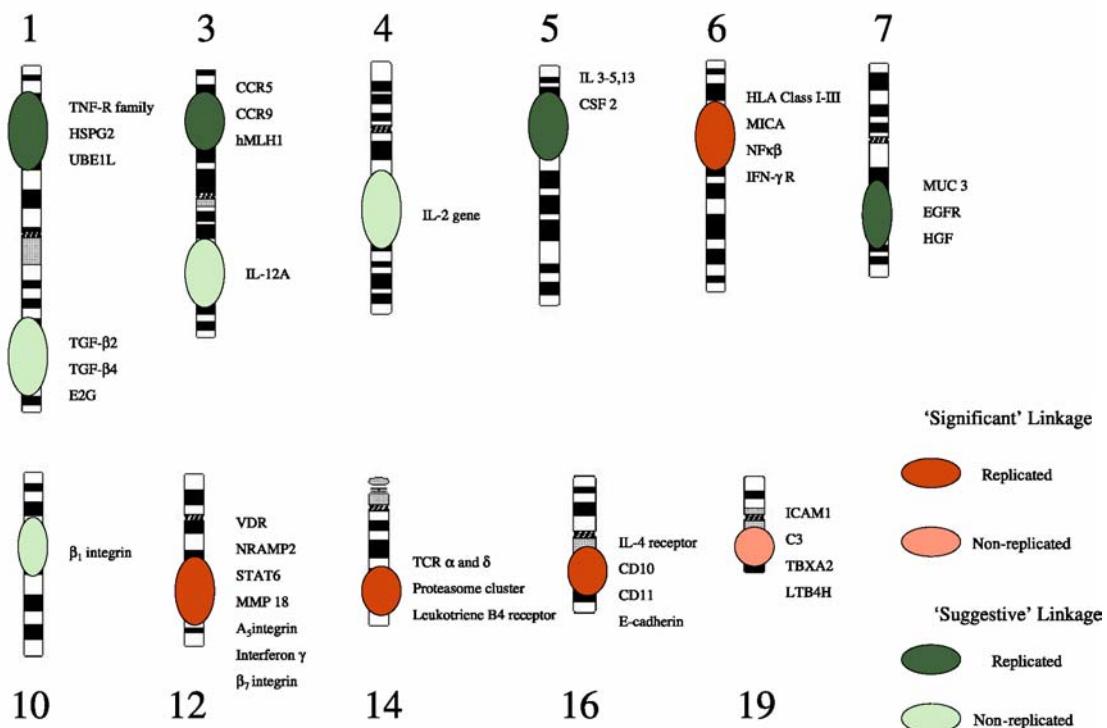


Abb. 11 Chromosomal Lokalisation verschiedener CED Kandidatenloci. Dargestellt sind jeweils die Lage auf dem Chromosom und die darin liegenden potentiellen Kandidatengene. MUC3 liegt dabei in einer mit CED assoziierten Region auf Chromosom 7.

Betrachtet man die chromosomal Lokalisation der Mucine, so liegen diese ausschließlich innerhalb bzw. in unmittelbarer Nähe der beschriebenen CED Kandidatenloci (Tabelle 10).

Tabelle 10 Chromosomal Lokalisation der Mucin Gene und der CED Kandidatenloci

UniGene ID	Gene Title	Gene Symbol	Chromosomal Localisation	IBD locus
Hs.1154	mucin 9	OVGP1	1p13	1p13.1-q21
Hs.89603	mucin 1	MUC1	1q21	1p13.1-q21
Hs.5940	mucin 13	MUC13	3q13.3	3q13.1
Hs.69321	mucin 20	MUC20	3q29	3q25-q28
Hs.369646	mucin 4	MUC4	3q29	3q25-q28
Hs.103944	mucin 7	MUC7	4q13-q21	4q22-q31
Hs.554764	mucin 3A	MUC3A	7q22	7p13-q21
Hs.489354	mucin 3B	MUC3B	7q22	7p13-q21
Hs.521091	mucin 11	MUC11	7q22	7p13-q21
Hs.284199	mucin 12	MUC12	7q22	7p13-q21
Hs.271819	mucin 17	MUC17	7q22	7p13-q21
Hs.24139	mucin 15	MUC15	11p14.3	11p12-11p15.5
Hs.398100	mucin 6	MUC6	11p15.5-p15.4	11p12-11p15.5
Hs.523395	mucin 5B	MUC5B	11p15	11p12-11p15.5
Hs.103707	mucin 5AC	MUC5AC	11p15	11p12-11p15.5
Hs.315	mucin 2	MUC2	11p15.5	11p12-11p15.5
Hs.511397	mucin 18	MCAM	11q23.3	11q23
Hs.244017	mucin 19	MUC19	12q12	12p13.2-q24
Hs.533957	mucin 8	MUC8	12q24.3	12p13.2-q24
Hs.432676	mucin 16	MUC16	19q13.2	19p13-q13
---	mucin 10	MUC10	---	

Gegenüberstellung der chromosomalen Lokalisation aller humanen Mucine mit den jeweiligen CED Kandidatenloci, geordnet nach aufsteigender Chromosomenzahl. Mucin10 ist bisher nur in der Maus und in der Ratte näher charakterisiert.

Um zu überprüfen, ob SNPs in Mucin Genen für CED prädisponieren, wurde die allelische Diskriminierung von Mucin SNPs in MC-, CU- und Kontroll Kollektiven bestimmt. Pro Mucin wurde je ein SNP genotypisiert, welcher in einem Exon (Ausnahme: MUC12) lag und bevorzugt einen Aminosäureaustausch (Ausnahme: MUC1) verursacht (Abb. 12). Als Positivkontrollen dienten zwei zusätzlich NOD2 SNPs (NOD2-G908R und NOD2-R702W), dessen Assoziationen mit Morbus Crohn bereits gezeigt werden konnte [81][82].

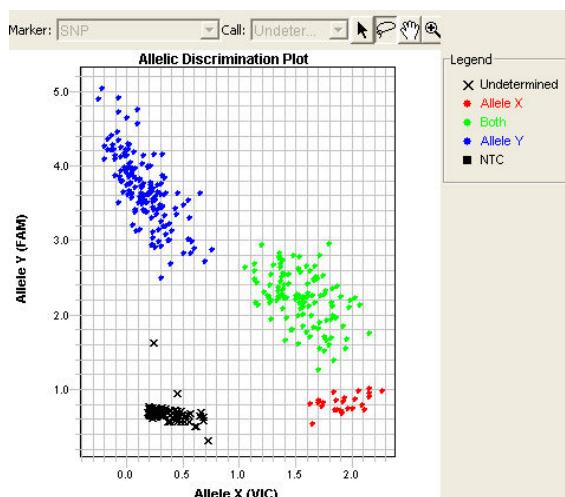


Abb. 12 Punktewolke der allelischen Diskriminierung des MUC4-A585S Polymorphismus. Dargestellt ist das Ergebnis einer 384-Well Platte, wobei die farbigen Kategorien den drei möglichen Genotypen entsprechen. Hier bedeutet blau Homozygotie für Thymin, rot Homozygotie für Guanin, grün Heterozygotie für Guanin und Thymin und schwarz leere Wells bzw. nicht bestimmbare Genotypen.

Die gemessenen Kollektive umfassten 220 DNAs von Colitis ulcerosa Patienten, 181 DNAs von Morbus Crohn Patienten und 250 DNAs von gesunden Blutspendern. Es konnten bei mindestens 87,9% (NOD2-R702W bei Morbus Crohn) der DNAs der Genotyp bestimmt werden, wobei die Gesamtquote bei 94,6% lag. Eine statistisch signifikante Assoziation mit Morbus Crohn zeigte sich bei MUC2-V116M ($P=0,003$), NOD2-G908R ($P=0,001$) und NOD2-R702W ($P=0,008$), während MUC4-A585S ($P=0,025$) und MUC13-R502S ($P=0,0003$) mit Colitis ulcerosa assoziiert waren (Tabelle 11). Auffällig war die deutliche Signifikanz der beiden NOD2 SNPs bei Morbus Crohn, nicht aber bei Colitis ulcerosa, was die Qualität der verwendeten Kollektive und der Messmethode bestätigt. Diese Ergebnisse legen Beteiligung von genetischen Variationen in Mucinen an der Entstehung von CED nahe.

Tabelle 11 Allelische Diskriminierung von Mucin- und NOD2 SNPs bei CED

SNP	n VIC	% VIC	n FAM	% FAM	n both	% both	P-value	Chi-square	
MUC2-V116M	A	A	G	G	A/G	A/G			
VWF domain	UC	9	4,6%	119	60,4%	69	35,0%	0,512	1,338
locus: 11p15	CD	5	3,0%	121	73,3%	39	23,6%	0,003	11,857
	Co	8	3,3%	139	57,0%	97	39,8%		
MUC4-A585S	G	G	T	T	G/T	G/T			
VWF domain	UC	15	7,2%	99	47,6%	94	45,2%	0,025	7,401
locus: 3q29	CD	16	9,5%	96	56,8%	57	33,7%	0,921	0,165
	Co	25	10,7%	132	56,4%	77	32,9%		
MUC13-R502S	A	A	C	C	A/C	A/C			
cytoplasmic tail	UC	116	56,3%	0	0,0%	90	43,7%	0,0003	16,422
locus: 3q13.1	CD	102	58,6%	10	5,7%	62	35,6%	0,436	1,660
	Co	131	52,6%	19	7,6%	99	39,8%		
NOD2-G908R	C	C	G	G	C/G	C/G			
locus: 16q21	UC	0	0,0%	207	95,8%	9	4,2%	0,284	1,147
	CD	1	0,6%	148	89,7%	16	9,7%	0,001	13,638
	Co	0	0,0%	242	98,0%	5	2,0%		
NOD2-R702W	C	C	T	T	C/T	C/T			
locus: 16q21	UC	193	90,2%	1	0,5%	20	9,3%	0,272	2,607
	CD	136	85,5%	6	3,8%	17	10,7%	0,008	9,757
	Co	215	87,0%	0	0,0%	32	13,0%		

Allelische Diskriminierung von MUC2, MUC4, MUC13 und NOD2 SNPs in CU- (n=220), MC- (n=181) und Kontroll- (n=250) Kollektiven. Dargestellt sind Anzahl (n), die Prozentzahl (%) und die statistische Auswertung (P-value und Chi-square) der gemessenen Genotypen jeweils im Vergleich zur Kontrolle. Statistisch signifikante Assoziationen sind fett hervorgehoben. Für jedes SNP ist der Aminosäureaustausch, der CED Kandidatenlocus und die betroffene Proteindomäne angegeben. VWF, von-Willebrand-Faktor; FAM, 6-carboxyfluorescein markierte allel spezifische Sonde; VIC, VIC-Farbstoff markierte allel spezifische Sonde

4.10 Expressionsanalyse von Genen in CED Kandidatenloci

Um weitere für CED relevante Gene zu identifizieren und näher zu charakterisieren, wurde eine Kombination aus Assoziationsstudien mit Expressionsanalysen angewandt. Bei dieser, auch *mapping and arraying* genannten Strategie, wurden zuerst alle Gene, die in beschriebenen CED Kandidatengenloci lokalisiert sind ermittelt und deren differentielle Regulation bei CED bestimmt. Anschließend wurde versucht innerhalb der dysregulierten Gene funktionale oder transkriptionelle Cluster zu finden. Ausgehend von der im vorherigen Kapitel bereits beschriebenen Metaanalyse von 11 genomweiten CED *linkage* Studien [80], wurden aus den Primärpublikationen die genetischen Marker ermittelt, die dort als signifikant mit CED assoziiert beschrieben wurden. Diese sogenannten *sequence-tagged-site* (STS) Marker definieren eine exakte genomische Position auf dem Chromosom. In der *University of California Santa Cruz Genome Browser* Datenbank (<http://genome.ucsc.edu>) sind die genomischen Positionen von STS-Markern und Genen abgelegt, was eine Verknüpfung beider Datensätze ermöglicht. Wurde ein CED Locus von zwei STS-Markern eingegrenzt, wurden alle Gene dazwischen ermittelt, wohingegen bei einem zentralen STS-Marker sämtliche Gene in einem Bereich von jeweils 4Mbp links und recht davon identifiziert wurden. Auf die so extrahierten Gene wurden anschließend die CED DNA-Microarrayergebnisse abgebildet und deren differentielle Regulation bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa bestimmt. In die Analyse gingen nur Loci mit einer hohen Evidenz ein, d.h. sie zeigten eine genomweite Signifikanz und konnten idealerweise in einem unabhängigen Experiment wiederholt werden. Dies traf auf 23 der insgesamt 38 beschriebenen CED Kandidatenloci zu. Tabelle 12 zeigt alle bei CED differentiell regulierten Gene in diesen Loci, deren Expressionsänderung sich, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, mindestens um den Faktor zwei unterschied. Weiterhin sind die zugrunde liegenden STS-Marker, die exakte Lage auf dem Chromosom und die Gesamtzahl der Gene in den einzelnen Loci angeben. Insgesamt handelte es sich um 3367 Gene von denen 476 (entspricht 14,1%) bei CED differentiell reguliert waren.

Tabelle 12 Differentielle Regulation von Genen aus mit CED assoziierten Regionen

UniGene	Title	Symbol	Co_leum_Sig	Co_leum_p	CD_leum_Sig	CD_leum_p	CD_leum_Fc	CD_leum_Ch	UC_leum_Sig	UC_leum_p	UC_leum_Fc	UC_leum_Ch	Co_colon_Sig	Co_colon_p	CD_colon_Fc	CD_colon_Ch	UC_colon_Sig	UC_colon_p	UC_colon_Fc	UC_colon_Ch
0 1p36.2-p32 (IBD7) (markers:D1S552; D1S234; D1S507; D1S1597) (genes in locus:202)																				
Hs.468675	podoplanin	PDPN	4.2	-	7.5	-	1.6	NC	7.1	-	1.4	NC	2.9	-	3.6	-	-1.1	NC	31.2	+ 14.9
Hs.467637	Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)	CDC42	1427.5	++	1342.5	++	1.1	NC	1015.0	++	-1.2	NC	1429.4	++	2947.5	++	2.0	NC	743.7	++ 19.0
Hs.376681	mitofusin 2	MFN2	303.7	++	333.9	++	-1.1	NC	334.2	++	1.0	NC	366.5	++	152.0	++	-3.0	D	170.3	++ 2.5
Hs.9541	complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	C1Qa	336.4	++	307.0	++	1.1	NC	376.3	++	1.1	NC	373.4	++	237.7	++	-1.6	D	89.6	++ 2.5
Hs.6980	alido-keto reductase family 7, member A3 (afflatoxin aldehyde reductase)	AKR7A3	421.8	++	460.4	++	1.1	NC	499.1	++	1.1	NC	455.7	++	168.1	++	-2.6	D	238.3	++ 1.7
Hs.468972	AT rich interactive domain 1A (SWI- like)	ARID1A	195.8	++	164.0	++	-1.5	NC	297.9	++	1.1	NC	373.4	++	96.6	++	-2.3	D	188.2	++ 1.5
Hs.466910	cytidine deaminase	CDA	153.4	++	114.4	++	-1.4	NC	81.0	++	-1.9	D	184.1	++	52.7	-	-2.8	D	65.1	++ 2.3
Hs.440544	chloride intracellular channel 4	CLIC4	135.0	++	98.0	++	1.3	NC	97.2	++	1.0	NC	121.0	++	157.0	++	1.4	NC	206.5	++ 2.1
Hs.252967	chromosome 1 open reading frame 144	C1orf144	155.1	++	81.1	-	-1.5	MD	157.8	++	1.1	NC	196.7	++	69.1	+	-1.4	NC	87.0	- 2.8
Hs.194333	E2F transcription factor 2	E2F2	307.4	++	131.7	-	-2.0	D	212.2	-	-1.4	D	488.9	++	157.3	-	-1.7	D	348.1	++ 1.2
Hs.1422	Gardner-Rasheed telomere sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog	FGR	26.0	-	17.9	-	-1.1	NC	46.8	-	1.9	NC	21.6	-	38.9	-	2.3	NC	59.9	++ 2.6
Hs.76057	UDP-galactose 4-epimerase	GALE	170.0	++	69.9	++	-1.6	MD	103.7	++	-1.3	NC	222.1	++	67.5	++	-2.6	D	136.5	++ 1.1
Hs.523413	myomesin family, member 3	MYOM3	67.7	+	111.6	++	1.2	NC	124.2	++	1.5	NC	54.2	+	17.1	-	-2.8	D	74.7	- 1.1
Hs.20013	CCNDBP1 interactor	CBP1	162.5	+	329.8	+	2.0	NC	163.5	+	1.3	NC	146.8	+	264.2	++	1.5	NC	216.9	++ 1.2
Hs.33455	peptidyl arginine deiminase, type II	PADI2	430.7	++	167.3	++	-2.1	MD	187.1	+	-2.1	D	502.8	++	562.5	++	1.2	NC	583.9	++ 1.2
Hs.477083	platelet-activating factor acetylhydrolase 2, 40kDa	PAFAH2	94.0	++	43.8	+	-1.5	D	53.5	+	1.2	NC	67.5	+	31.2	-	-1.6	D	30.4	++ 2.1
Hs.466804	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)	PLA2G2A	277.3	++	297.6	++	1.0	NC	2814.4	++	-1.1	NC	2068.9	++	1709.0	++	-1.3	NC	738.3	++ 2.8
Hs.149957	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 1	RPS6KA1	465.2	++	408.3	++	-1.3	NC	387.7	++	-1.2	NC	447.2	++	256.5	++	-2.3	D	319.4	++ 1.9
Hs.523718	stratifin	SFN	2243.3	++	2059.5	++	-1.3	NC	895.0	++	-2.6	D	2420.1	++	3346.8	++	1.2	NC	3391.1	++ 1.3
Hs.109051	SH3 domain containing glutamic acid-rich protein like 3 // SH3 domain	SH3BGRL3	644.2	++	254.1	++	-2.5	D	376.7	++	1.5	D	874.7	++	493.4	++	-1.7	D	379.6	++ 2.3
Hs.469175	synaptotagmin-like 1	SYTL1	372.6	+	156.0	-	-2.1	D	422.5	+	1.1	NC	381.7	+	130.0	-	-1.9	D	227.0	- 1.1
Hs.433764	zinc finger and BTB domain containing 17	ZBTB17	76.2	+	56.6	++	-1.3	NC	63.1	++	1.0	NC	66.3	+	36.4	+	-1.6	D	21.8	- 2.8
0 1q43-q44 (markers:D1S2670 to D1S2682) (genes in locus:38)																				
Hs.98206	Gremlin 2 homolog, cysteine knot superfamily (Xenopus laevis)	GREM2	15.0	+	18.7	+	1.6	NC	11.5	+	1.1	NC	19.0	-	37.8	+	2.1	NC	36.6	- 2.5
Hs.534399	opsin 3 (encephalopsin, panopsin) // opsin 3 (encephalopsin, panopsin)	OPN3	125.5	++	137.9	++	1.1	NC	113.0	++	1.0	NC	168.5	++	352.8	++	2.8	NC	325.0	++ 1.9
Hs.546424	SET and MYND domain containing 3	SMYD3	38.0	-	42.6	-	1.1	NC	40.0	-	-1.1	NC	22.0	-	72.8	+	2.5	MI	73.8	++ 2.0
Hs.421238	zinc finger protein 124 (H2F-16)	ZNF124	8.9	-	55.6	++	5.3	+	18.6	-	2.6	NC	26.9	-	54.8	++	2.0	NC	19.0	- 2.1
0 2p11 (markers:D2S2333) (genes in locus:40)																				
Hs.135569	lational homolog 8 (Drosophila)	ATOH8	17.2	-	74.2	+	5.7	NC	92.6	+	2.5	NC	85.4	+	69.1	-	1.5	NC	61.7	++ 1.7
Hs.516155	capping protein (actin filament), gelsolin-like	CAPG	197.2	++	75.5	++	-3.0	D	146.7	+	-1.3	NC	238.8	++	79.9	++	-3.0	D	121.9	++ 2.0
Hs.11156	hypothetical protein LOC51255	LOC51255	791.6	+	916.1	-	1.0	NC	808.7	+	-1.1	NC	995.7	+	411.7	+	-2.3	D	1508.9	++ 1.2
Hs.424184	Plasminogen-like B1	PLGL	125.2	++	68.1	++	-1.5	D	160.8	++	1.0	NC	85.2	++	45.7	+	-2.3	D	38.2	++ 2.3
Hs.14894	trans-golgi network protein 2	TGOLN2	733.9	++	909.0	++	1.4	NC	808.4	++	1.1	NC	554.0	++	991.6	++	2.0	NC	818.8	++ 1.3
0 2q23.2-q35 (markers:D2S1776 to D2S1391) (genes in locus:75)																				
Hs.516543	alkylglycerone phosphate synthase	AGPS	71.4	++	40.9	+	-2.0	D	45.4	++	-1.4	NC	95.7	++	42.7	++	-2.0	D	50.6	++ 1.6
Hs.221941	Cytochrome b reductase 1	CYBRD1	324.8	++	304.6	++	1.0	NC	426.8	++	1.5	NC	117.8	++	21.6	-	-4.0	D	36.4	++ 3.2
Hs.179608	aldehyde dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	DHR95	389.8	++	166.7	++	-2.3	D	160.5	++	-3.0	D	807.7	++	1185.4	++	1.5	NC	1532.1	++ 1.6
Hs.128453	Frizzled-related protein	FRZB	50.6	+	119.0	+	2.6	NC	78.0	+	1.4	NC	63.6	+	136.7	++	2.6	NC	72.8	++ 1.1
Hs.123700	homeo box D10	HOXD10	35.1	-	30.6	-	-1.1	NC	29.9	-	-1.1	NC	52.3	-	123.2	+	2.5	MI	58.9	++ 1.1
Hs.41086	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide t	PLEKHA3	259.5	++	399.5	++	1.6	NC	293.3	++	1.0	NC	305.8	++	475.6	++	2.0	NC	520.8	++ 1.4
Hs.470679	secernin 3	SCRN3	170.4	++	193.5	++	1.1	NC	138.0	++	-1.1	NC	125.5	++	266.0	++	2.1	NC	176.6	++ 1.4
Hs.546301	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	SSB	42.6	+	83.4	++	1.6	NC	41.0	++	-1.3	NC	68.1	++	114.6	++	2.3	NC	40.9	++ 1.1
0 3p26-p14 (markers:D3S1573; D3S1766 to D3S1285; D3S2432; D3S1283) (genes in locus:198)																				
Hs.103665	villin-like	VILL	10.6	++	264.6	++	-1.3	NC	316.9	++	-1.1	NC	393.9	+	139.7	+	-2.1	D	139.1	++ 1.9
Hs.413095	solute carrier family 6 (proline IMINo transporter), member 20	SLC6A20	100.4	++	150.3	++	1.6	NC	122.2	++	1.4	NC	73.5	++	23.2	-	-3.0	D	45.9	++ 1.6
Hs.234521	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	MAPKAPK3	55.1	++	21.8	+	-2.6	D	18.3	+	-2.1	NC	51.0	+	25.1	-	-1.7	MD	27.9	- 1.3
Hs.517973	macrophage stimulatory receptor 1 (receptor c-met-related tyrosine kinase)	MST1R	227.2	++	136.3	++	-1.6	D	170.0	++	-1.4	MD	282.7	++	109.6	+	-2.1	D	219.3	++ 1.3
Hs.301921	chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	55.9	+	79.2	+	1.4	NC	76.8	+	1.2	NC	74.6	+	110.4	+	1.1	NC	179.4	++ 2.1
Hs.315177	interferon-related developmental regulator 2	IFRD2	244.3	++	98.4	+	-1.7	D	153.6	++	-1.2	NC	189.5	++	128.7	++	-1.5	D	118.8	++ 2.0
Hs.334707	Ras-induced serine 1	RIS1	16.2	-	29.6	-	1.9	NC	23.2	-	-1.5	NC	14.1	-	24.6	-	1.5	NC	77.6	++ 4.9
Hs.546245	chemokine (C-C motif) receptor 5	CCR5	79.2	-	104.2	-	1.2	NC	86.1	-	1.2	NC	69.2	-	75.5	MI	72.5	++ 4.9		
Hs.476092	C-type lectin domain family 3, member B	CLEC3B	36.4	+	71.9	+	1.1	NC	74.8	+	1.3	NC	64.8	+	28.5	-	-1.4	D	3.5	- 14.9
Hs.78913	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1	CX3CR1	25.8	-	24.4	-	1.1	NC	13.9	-	-2.0	NC	12.9	-	31.3	-	3.0	NC	25.0	++ 2.1
Hs.420796	hypothetical protein MGC15429	MGC15429	1340.0	++	1208.5	++	1.0	NC	1213.2	++	-1.1	NC	1312.2	++	552.0	++	-2.0	D	439.8	++ 2.3
Hs.82222	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, sec	SEMA3B	195.9	++	157.3	++	-1.2	NC	271.3	++	1.3	NC	175.2	+	23.9	-	-6.5	D	49.9	++ 4.0
Hs.241558	aridine homolog 2 (Drosophila)	ARIH2	36.9	+	50.4	+	1.1	NC	63.7	+	1.1	NC	47.3	+	29.0	+	-2.1	D	47.7	++ 9.8
Hs.106741	BRCA1 associated protein-1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase)	BAP1	199.0	++	90.3	+	-1.5	D	152.8	++	1.1	NC</								

UniGene	Title	Symbol	Co.._leum_Sig	Co.._leum_p	CD.._leum_p	CD.._leum_Fc	CD.._leum_Ch	UC.._leum_p	Co.._leum_Fc	Co.._leum_Ch	Co.._colon_Sig	Co.._colon_p	CD.._colon_Sig	CD.._colon_p	UC.._colon_Sig	UC.._colon_p						
Hs_478064	Arginine-serine-rich coiled-coil 1	MGC12197	4.1	-	21.6	-	4.9	NC	17.5	-	4.0	NC	11.5	-	33.7	**	3.2	10.2	-	-1.1	NC	
Hs_58992	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	SMC4L1	122.5	**	82.1	**	-1.5	D	114.2	**	-1.1	NC	166.8	**	79.5	**	-2.0	D	134.2	**	-1.1	NC
Hs_518346	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein ga)	SSR3	940.0	**	709.9	**	1.0	NC	712.3	**	-1.3	NC	1234.0	**	1263.7	**	1.1	NC	2675.0	**	2.1	
Hs_529609	ATPase type 13A3	ATP13A3	64.0	**	97.2	**	1.2	NC	74.4	**	1.1	NC	61.9	**	126.8	**	1.9	NC	130.7	**	2.0	I
Hs_333181	Welch-like 6 (Drosophila)	KLHL6	323.3	**	79.2	**	-3.2	D	284.2	**	1.0	NC	110.4	**	142.8	**	1.1	NC	220.1	**	1.7	I
Hs_518403	SM3P mannosyltransferase	SMP3	217.2	**	69.7	**	-2.6	D	117.6	**	-1.9	D	244.4	**	251.1	**	-1.1	NC	409.9	**	1.1	NC
Hs_478746	Centaunin, beta 2	CENTB2	95.8	**	142.1	**	1.6	I	169.1	**	1.5	NC	86.8	**	218.9	**	2.6	I	174.2	**	2.0	I
Hs_131269	Retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1	RARRES1	144.1	**	224.7	**	1.6	I	176.4	**	1.4	I	148.7	**	311.1	**	2.5	I	202.3	**	1.6	I
Hs_518524	KIAA0794 protein	KIAA0794	61.3	**	82.2	**	2.3	I	43.0	**	1.0	NC	39.0	**	94.3	**	3.2	I	32.5	**	-1.3	NC
Hs_478588	B-cell CLL/lymphoma 6 (zinc finger protein 51)	BCL6	107.2	**	85.7	**	-1.5	NC	117.2	**	-1.1	NC	72.4	**	120.4	**	1.3	I	131.1	**	2.0	I
Hs_478746	Centaunin, beta 2	CENTB2	95.8	**	142.1	**	1.6	I	169.1	**	1.5	NC	86.8	**	218.9	**	2.6	I	174.2	**	2.0	I
Hs_369052	selenoprotein T	SELT	367.4	**	240.6	**	-1.4	D	345.8	**	-1.2	NC	458.7	**	206.6	**	-2.1	D	358.1	**	-1.1	NC
Hs_302047	phospholipase C-like 3	PLCL3	18.9	-	62.3	**	2.5	NC	25.6	-	1.5	NC	20.8	**	65.2	**	2.5	I	36.3	**	1.3	NC
Hs_429879	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	EHHADH	13.8	-	31.5	**	3.5	I	23.0	-	2.3	NC	32.2	-	38.4	-	2.1	NC	74.3	**	1.9	I
Hs_2913	EPH receptor B3	EPHB3	57.3	-	28.0	-	-2.0	NC	49.4	-	-1.1	NC	90.7	-	18.1	-	-4.6	D	20.6	-	-4.3	D
Hs_549152	G protein-coupled receptor 171	GPR171	11.2	-	41.3	-	-4.0	M	31.1	-	1.6	NC	7.8	-	32.5	-	4.9	NC	15.3	-	2.6	NC
Hs_374191	leprecan-like 1	LEPREL1	96.9	-	5.7	-	-18.4	D	9.1	-	-11.3	D	126.8	-	19.7	-	-5.7	D	66.6	-	-1.9	D
Hs_68864	lipase, member H	LIPH	217.2	-	162.8	-	-1.1	NC	72.7	-	-2.6	D	282.0	-	225.9	-	-1.6	NC	192.4	-	-1.1	NC
Hs_369646	Mucin 4, tracheobronchial	MUC4	71.0	-	13.3	-	-4.0	D	15.6	-	-3.5	D	189.5	**	74.7	**	-2.0	D	218.2	**	1.5	NC
Hs_207459	ST6 beta-galactosamidase alpha-2,6-sialyltransferase 1	ST6GAL1	223.3	**	139.5	**	-1.6	D	286.3	**	1.1	NC	193.3	**	236.1	**	1.3	NC	443.3	**	2.0	I
Hs_518403	SM3P mannosyltransferase	SMP3	217.2	**	69.7	**	-2.6	D	117.6	**	-1.9	D	244.4	**	251.1	**	-1.1	NC	409.9	**	1.1	NC
Hs_529618	Transferin receptor (p90, CD71)	TFRC	1327.5	**	945.7	**	1.1	NC	698.3	**	-1.0	D	666.2	**	1584.0	**	2.0	I	1200.9	**	1.5	NC
Hs_549226	Transmembrane protein 41A	TMEM41A	598.0	**	566.3	**	1.0	NC	492.0	**	-1.1	NC	550.3	**	130.8	**	-3.2	D	172.4	**	-3.2	D
Hs_518513	tyrosine kinase, non-receptor, 2	TKN2	48.7	-	30.5	-	-1.3	NC	40.4	-	1.1	NC	32.6	-	10.8	-	-2.5	D	39.1	-	1.1	NC
Hs_52526	TSC22 domain family, member 2	TSC22D2	83.2	**	182.0	**	2.1	I	119.4	**	1.5	M	97.2	**	211.3	**	2.0	I	193.7	**	1.3	NC
Hs_477921	WW domain containing transcription regulator 1	WWTR1	27.0	-	71.1	**	3.7	I	30.2	**	1.6	I	39.4	**	57.3	**	2.3	I	57.0	**	1.7	I
0	4q22-q31 (IBD5) (markers:D4S1647; D4S263; D4S1575 to D4S424) (genes in locus:111)																					
Hs_370661	phosphodiesterase 5A, cGMP-specific	PDE5A	148.0	**	227.6	**	1.4	I	148.3	**	1.1	NC	162.8	**	274.1	**	2.0	I	222.5	**	1.3	I
Hs_208208	TNF-AIP3 interacting protein 3	TNIP3	4.1	-	5.6	-	1.1	NC	3.7	-	-1.5	NC	6.2	-	3.5	-	-1.6	NC	37.9	-	4.0	I
Hs_412939	ELOV family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1)	ELOV6	112.4	**	174.9	**	1.2	NC	45.7	**	-1.6	D	331.6	**	635.2	**	2.1	I	562.6	**	1.6	I
Hs_211869	dickopf homolog 6 (Xenopus laevis)	DKK2	15.5	-	4.0	-	-1.4	NC	16.4	-	1.1	NC	16.8	-	3.0	-	-9.2	D	28.9	-	-1.5	NC
Hs_480519	phospholipase A2, group XIIa	PLA2G12A	31.7	-	57.3	-	2.3	I	45.3	-	1.5	NC	66.4	-	98.2	-	1.9	I	52.9	-	-1.1	NC
Hs_282265	fatty acid binding protein 2, intestinal	FABP2	46.2	-	24.9	**	1.5	NC	50.9	-	-1.1	NC	76.3	-	40.3	-	-1.9	NC	6.9	-	-4.9	D
Hs_435765	glutamyl/aminopeptidase (aminopeptidase A)	ENPEP	57.6	**	1177.8	**	1.7	I	1058.2	**	1.6	I	53.4	**	568.5	**	1.1	NC	50.3	**	-1.3	I
Hs_310640	TRAF-interacting protein with a forkhead-associated domain	TIFA	322.4	**	377.0	**	1.2	NC	364.8	**	1.1	NC	224.4	**	689.3	**	2.8	I	319.4	**	1.4	NC
Hs_480615	synaptotagmin 2	SYNPO2	242.0	**	423.5	**	2.3	I	297.0	**	1.3	I	156.7	**	380.2	**	2.5	I	146.9	**	1.1	NC
Hs_312485	I factor (complement)	IF	73.2	**	137.8	**	2.3	I	140.5	**	1.1	NC	34.4	**	101.4	**	2.0	I	94.4	**	2.1	I
Hs_58974	Bardet-Biedl syndrome 7	BBST	56.9	-	82.1	-	1.5	NC	53.8	-	-1.1	NC	54.7	-	135.7	-	2.3	I	80.8	-	1.1	NC
Hs_69851	nucleolar protein family A, member 1 (H/ACA small nucleolar RNPs)	NOLA1	72.4	-	99.2	-	1.2	NC	89.7	-	-1.1	NC	102.2	-	239.3	-	2.3	I	102.3	-	1.1	NC
Hs_292472	SEC24 related gene family, member B (S. cerevisiae)	SEC24B	105.1	**	201.7	**	2.0	I	162.5	**	1.6	I	161.3	**	232.6	**	1.6	I	229.1	**	1.1	NC
Hs_533185	MAD2 mitotic arrest-deficient-like 1 (yeast)	MAD2L1	41.2	-	78.3	-	1.7	I	49.1	-	-1.1	NC	70.8	-	118.7	-	2.0	I	78.1	-	1.4	NC
Hs_85137	cyclin A2	CCNA2	51.7	**	105.2	**	1.9	I	52.8	**	1.1	NC	53.5	-	170.9	**	2.3	I	129.5	**	1.4	NC
Hs_92282	paired-like homeodomain transcription factor 2	PTTX2	55.2	-	14.6	-	-1.7	D	19.8	-	-3.2	D	18.3	-	40.9	-	-2.3	NC	45.8	-	1.9	I
Hs_111554	ADP-ribosylation factor-like 7	ARL7	68.0	-	107.8	-	1.4	NC	94.6	-	1.2	NC	42.4	-	91.1	-	2.3	I	54.6	-	1.3	NC
Hs_4	Alcohol dehydrogenase 1B (class I), beta polypeptide	ADH1B	45.6	-	66.9	-	1.7	I	87.9	-	1.9	I	28.5	-	64.4	-	2.6	I	56.5	-	1.9	NC
Hs_480400	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	BANK1	62.1	-	11.6	-	-3.5	D	151.8	-	2.6	I	36.3	-	33.5	-	-1.4	NC	27.9	-	-1.4	NC
Hs_152913	Endomucin	EMCN	95.3	-	185.3	-	2.3	I	124.8	-	1.3	NC	104.6	-	189.1	-	1.9	NC	182.3	-	1.4	NC
Hs_518994	NMDA receptor regulated 1	NARG1	17.8	-	38.2	-	2.1	I	20.3	-	-1.0	NC	16.6	-	56.8	-	3.5	I	18.3	-	-1.1	NC
Hs_518989	protoactinin 18	PCDH18	536.8	**	93.4	**	2.3	I	489.2	**	-1.1	NC	756.7	**	1166.0	**	2.1	I	1002.6	**	1.6	I
Hs_435512	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	PP3CA	905.0	**	926.3	**	1.1	NC	855.2	**	1.0	NC	820.1	**	2069.7	**	2.1	I	1050.8	**	1.1	NC
Hs_534396	RAB33B, member RAS oncogene family // RAB33B, member RAS	RAB33B	43.7	-	49.7	**	2.0	I	30.6	-	1.2	NC	25.6	-	47.4	-	1.1	NC	20.8	-	1.1	NC
Hs_480815	short coiled-coil protein	SCOC	129.4	**	98.1	-	-2.1	D	142.0	**	-1.1	NC	163.1	**	63.1	**	-2.5	D	138.8	**	-1.3	D
Hs_6682	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) n	SLC7A11	31.4	-	35.3	-	-1.4	NC	25.2	-	-1.2	NC	14.5	-	33.8	-	1.3	NC	39.3	**	2.3	I
0	5q31-q35 (IBD5) (genes:D5S816 to D5S1480) (genes in locus:199)																					
Hs_106534	chromosome 5 open reading frame 14	C5orf14	129.1	**	199.7	**	1.5	I	137.8	**	1.2	NC	160.7	**	226.6	**	1.4	NC	333.3	**	2.1	I
Hs_111779	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin) // secreted prote	SPARC	76.4	-	191.1	-	2.6	I	119.1	-	1.5	I	104.4	-	198.9	-	2.0	I	261.0	-	2.6	I
Hs_105818	cyclin-dependent kinase-like 3	CDKL3	8.9	-	9.7	-	-1.1	NC	45.9	-	-3.5	I	7.0	-	6.9	-	-1.0	NC	27.6	-	2.8	NC
Hs_369397	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	TGFB1	235.5	**	630.2	**	2.0	I	255.6	**	1.0	NC</td										

UniGene	Title	Symbol	Co_leum_Sig	Co_leum_p	CD_leum_Sig	CD_leum_D	CD_leum_Fc	CD_leum_Ch	UC_leum_Sig	UC_leum_p	UC_leum_Fc	UC_leum_Ch	Co_colon_Sig	Co_colon_p	CD_colon_Sig	CD_colon_Fc	CD_colon_Ch	UC_colon_Sig	UC_colon_p	UC_colon_Fc	UC_colon_Ch	
Hs.520048	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	HLA-DRA	2662.1	++	2067.7	++	-1.2	NC	3023.0	++	1.2	NC	1786.1	++	748.2	++	-2.1	D	1050.1	++	-1.5	D
Hs.520049	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1 //I major histocompatibility antigen, class I, G	HLA-DRB1	4531.1	++	3916.8	++	-1.3	D	4492.7	++	-1.1	NC	2741.7	++	1097.9	++	-1.9	D	1316.2	++	-2.0	D
Hs.512152	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	HLA-G	3065.4	++	1859.1	++	-1.6	D	2737.4	++	-1.1	NC	2063.2	++	1123.4	++	-2.0	D	1333.7	++	-1.2	NC
Hs.518805	high mobility group AT-hook 1	HMG1	332.5	++	299.2	++	-1.1	NC	337.5	++	-1.1	NC	361.8	++	468.7	+	-1.6	D	217.9	+	-2.5	D
Hs.520028	heat shock 70kDa protein 1A	HSPA1A	706.4	++	901.3	++	-1.3	NC	479.6	++	-1.1	NC	464.4	++	1280.3	+	-2.1	NC	944.9	++	-1.2	NC
Hs.519601	Inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	ID4	39.9	++	109.7	++	-2.3	I	92.2	++	1.5	I	41.1	++	101.9	++	2.1	I	67.5	++	1.3	NC
Hs.76095	immediate early response 3	IER3	141.4	++	172.4	++	-1.0	D	65.6	++	-2.1	D	208.2	++	313.7	++	1.2	NC	253.3	++	-1.0	NC
Hs.444845	LEM domain containing 2	LEMD2	131.8	+	73.9	-	-2.8	D	143.4	-	-1.2	NC	125.3	+	70.1	-	-2.1	D	19.1	-	-8.6	D
Hs.116470	Leucine rich repeat containing 16	LRRC16	574.1	++	821.4	++	-1.4	I	585.1	++	1.0	NC	540.4	++	1095.1	++	2.0	I	731.6	++	-1.4	I
Hs.376208	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	301.9	++	47.7	-	-3.7	D	377.6	-	-1.3	I	115.2	++	42.3	-	-1.5	D	76.7	++	-1.4	NC
Hs.274417	mitochondrial ribosomal protein S18B	MRPS18B	110.1	+	61.4	-	-1.6	D	95.0	-	-1.1	NC	96.1	-	55.9	-	-2.1	D	26.1	-	-3.2	D
Hs.188882	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 3	NUDT3	87.7	+	122.2	+	-1.1	NC	84.0	+	-1.4	NC	111.4	+	98.3	++	-1.3	NC	49.5	++	-2.0	D
Hs.509545	pre-B-cell leukemia transcription factor 2	PBX2	101.4	+	332.5	+	-2.0	I	109.5	+	-1.1	NC	65.8	++	222.2	++	2.0	I	66.6	+	-1.1	NC
Hs.520026	valyl-tRNA synthetase	VARS	64.7	+	25.9	-	-2.1	D	45.4	++	-1.2	NC	81.4	++	37.0	+	-1.7	D	27.4	-	-2.5	D
Hs.55481	zinc finger protein 165	ZNF165	13.1	-	24.6	+	-2.0	I	16.3	-	-1.1	NC	20.1	-	18.6	-	-1.1	NC	23.4	-	1.0	NC
0	6q22-q27 (markers:D6S2436 to D6S305) (genes in locus:35)																					
Hs.363137	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2 (acetoacetyl Coenzyme A thioesterase)	ACAT2	122.8	++	74.9	++	-1.3	D	102.1	++	-1.2	NC	125.3	++	132.2	++	1.1	NC	294.8	++	2.5	I
Hs.291587	AT rich interactive domain 1B (SW1-like)	ARD1B	392.8	++	486.9	++	-1.2	NC	326.8	++	-1.2	NC	251.7	++	480.7	++	2.1	I	267.5	++	1.1	NC
Hs.242721	ATPase carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 1	SLC22A3	133.2	+	91.9	-	-1.5	NC	114.7	+	-1.1	NC	80.7	+	85.1	+	-1.1	NC	8.2	-	-5.7	D
Hs.487046	superoxide dismutase 2, mitochondrial	SOD2	61.7	++	49.1	++	-1.1	NC	45.5	++	1.0	NC	45.2	++	72.1	++	1.4	NC	253.9	++	5.7	I
Hs.529984	T-cell activation GTPase activating protein	TAGAP	253.3	++	168.0	++	-1.5	D	314.4	++	1.2	I	138.8	++	267.0	++	1.9	I	308.3	++	2.3	I
0	7q13-q21 (markers:D7S669; D7S820) (genes in locus:263)																					
Hs.413036	Williams Beuren syndrome chromosome region 22	WBSCR22	171.9	++	102.4	++	-1.7	D	170.5	++	-1.1	NC	206.7	++	117.7	++	-1.9	D	80.3	++	-2.3	D
Hs.354056	P450 (cytochrome) oxidoreductase	POR	213.2	+	102.4	+	-2.1	D	234.3	+	1.0	NC	172.1	+	58.0	+	-2.3	D	23.4	-	-4.9	D
Hs.269109	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, sec	SEMA3C	78.5	+	110.3	+	-1.1	NC	91.8	+	1.0	NC	69.5	++	341.2	++	2.3	I	361.2	++	1.9	I
Hs.488945	Atrophin-1 interacting protein 1	AIP1	28.2	++	34.5	++	-1.5	D	30.6	++	-1.1	NC	22.2	+	46.8	++	2.3	I	36.6	+	-1.4	NC
Hs.25640	claudin 3	CLDN3	385.9	+	295.5	-	-1.4	D	385.7	+	-1.2	NC	617.6	++	239.6	++	-2.6	D	94.4	+	-6.5	D
Hs.548405	NOL1 NOP2/Sun domain family, member 5	NSUN5	323.1	++	187.6	++	-1.6	D	290.1	++	1.0	NC	280.6	++	97.4	++	-2.0	D	167.3	++	-1.7	D
Hs.520446	Williams Beuren syndrome chromosome region 14	WBSCR14	81.4	+	67.9	-	-1.0	NC	98.6	-	-1.1	NC	56.6	+	35.2	-	-1.3	NC	16.8	-	-2.6	D
Hs.510927	Williams Beuren syndrome chromosome region 20C	WBSCR20C	240.7	++	119.9	+	-1.5	NC	202.6	++	-1.1	NC	196.7	+	67.4	+	-2.3	D	156.7	+	-1.2	NC
Hs.550749	DCK/Zp434A0131 protein	DCKZP434A0131	632.0	++	366.8	++	-1.9	D	485.3	++	-1.1	NC	503.3	++	373.2	++	-1.4	D	249.1	++	-2.1	D
Hs.488835	transmembrane protein induced by tumor necrosis factor alpha	TMIP1	92.7	++	122.4	+	-1.1	NC	112.8	+	1.1	NC	89.2	++	389.2	++	-2.3	D	415.0	++	-2.3	D
Hs.520942	Claudin 4	CLDN4	150.1	+	134.9	+	-1.1	NC	164.3	+	1.0	NC	213.5	++	142.2	++	-1.4	D	88.6	+	-2.3	D
Hs.61812	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	PTPN12	67.2	+	84.6	-	-1.3	NC	87.0	-	-1.2	NC	61.4	+	80.0	+	-1.6	NC	101.0	++	2.1	I
Hs.120949	CD36 antigen (collagen type I receptor, thrombospondin receptor)	CD36	153.4	++	391.7	++	-2.8	I	187.4	++	-1.3	I	127.3	++	308.9	++	-2.3	I	144.6	++	1.1	NC
Hs.520973	heat shock 27kDa protein 1	HSPB1	376.3	++	131.9	++	-3.2	D	187.5	++	-2.3	D	493.0	++	362.7	++	-1.9	D	381.3	++	-1.5	D
Hs.329266	Huntingtin interacting protein 1	HIP1	62.9	++	73.7	++	-1.0	NC	59.8	+	-1.1	NC	51.0	+	72.5	++	1.6	NC	105.2	++	2.1	I
Hs.411488	Rap2-binding protein 9	RIPB9	188.8	++	354.2	++	-2.3	I	257.9	++	-1.3	I	169.9	++	328.8	++	2.0	I	141.1	++	-1.4	MD
Hs.549260	Williams-Beuren Syndrome critical region protein 20 copy B	WBSCR20B	231.5	+	127.5	-	-1.7	NC	226.5	+	-1.1	NC	169.1	+	51.4	+	-2.1	D	102.4	++	-1.4	NC
Hs.489365	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	AP1S1	154.4	++	175.6	++	-1.1	NC	133.0	+	-1.4	NC	133.5	++	250.5	++	1.2	NC	61.1	+	-2.0	D
Hs.124126	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa	ARPC1A	549.5	++	346.5	++	-1.6	NC	491.6	++	-1.1	NC	748.6	++	247.7	++	-2.6	D	631.4	++	-1.1	NC
Hs.442047	argininosuccinate lyase	ASL	245.8	++	195.3	++	-1.3	NC	183.1	++	-1.4	NC	369.5	++	149.4	++	-2.0	D	365.0	++	-1.1	NC
Hs.489118	Chromosome 7 open reading frame 6	C7orf6	276.2	++	318.9	++	-1.0	NC	357.1	++	1.1	NC	336.6	++	278.9	++	1.2	NC	558.1	++	2.0	I
Hs.531987	KRIT1, ankyrin repeat containing	KRIT1	65.8	++	40.8	+	-1.6	D	73.1	+	-1.2	NC	50.5	++	30.5	++	-1.6	D	113.3	++	-4.9	D
Hs.38738	claudin 15	CLDN15	150.1	++	80.7	++	-1.2	D	92.5	++	-1.5	I	438.4	++	234.4	+	-1.7	D	68.8	-	-5.7	D
Hs.489142	Collagen type I, alpha 2	COL1A2	784.6	++	1234.4	+	-1.4	I	708.9	++	-1.1	NC	698.8	++	1090.0	++	1.2	NC	2920.4	++	3.7	I
Hs.442527	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	CYP3A4	1235.0	++	1716.5	++	-1.3	I	1838.5	++	-1.3	I	964.2	++	342.6	++	-3.2	D	98.8	++	-12.1	D
Hs.111944	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	CYP3A7	609.9	+	839.9	-	-1.2	NC	1144.7	++	-1.1	NC	475.4	++	113.2	-	-1.7	D	148.1	-	-2.0	D
Hs.180546	zinc finger protein 680	ZNF680	27.2	-	29.8	-	-1.1	NC	62.6	-	-1.5	NC	15.2	-	58.3	-	2.0	I	32.0	-	1.3	NC
Hs.185172	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	GNB2	341.7	+	171.5	+	-1.9	D	251.4	+	-1.4	NC	396.3	++	185.0	+	-2.1	D	50.2	-	-8.0	D
Hs.440384	hypothetical protein LOC285989	LOC285989	151.3	-	105.6	-	-1.7	D	198.2	+	1.0	NC	183.1	-	78.1	-	-2.0	D	195.0	-	-1.1	NC
Hs.406520	similar to CG14977-PA	LOC389541	316.2	++	223.8	++	-1.6	D	330.6	++	-1.1	NC	450.7	++	201.6	++	-2.1	D	495.6	++	1.1	NC
Hs.512217	monoacylglycerol O-acyltransferase 3	MOGAT3	423.3	+	217.7	-	-2.0	D	272.6	+	-1.1	NC	348.7	++	123.9	+	-3.0	D	101.5	+	-2.3	D
Hs.489355	mucin 12	MUC12	435.4	+	40.5	-	-8.0	D	97.1	-	-4.0	D	1050.1	++	246.2	+	-5.7	D	273.3	+	-4.6	D
Hs.271819	mucin 17	MUC17	173.2	++	2207.5	++	-1.2	NC	1994.9	++	-1.1	NC	1148.1	++	380.9	++	-4.3	D	501.6	++	-2.6	D
Hs.3281	neuronal pentraxin II	NPTX2	22.5	-	4.2	-	-4.9	NC	16.0	-	-1.1	NC	31.2	-	21.6	-	-1.1	NC	142.1	++	4.0	I
Hs.546405	NOL1 NOP2/Sun domain family, member 5	NSUN5	323.1	++	187.6	++	-1.6	D	290.1	++	1.0	NC	280.6</td									

UniGene	Title	Symbol	Co_leum_Sig	Co_item_p	CD_leum_Sig	CD_leum_D	CD_leum_Fc	CD_leum_Ch	UC_leum_Sig	UC_leum_p	UC_leum_Fc	UC_leum_Ch	Co_colon_Sig	Co_colon_p	CD_colon_Fc	CD_colon_Ch	UC_colon_Sig	UC_colon_p	UC_colon_Fc	UC_colon_Ch				
Hs.339278	Coatomer protein complex, subunit beta	COPB	738.0	++	961.1	++	1.4	I	710.0	++	1.1	NC	726.9	++	1251.0	++	2.0	I	962.1	++	1.2	NC		
Hs.546248	cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	CTSD	371.3	++	174.5	++	-2.1	D	417.8	++	1.0	NC	320.8	++	119.5	++	-2.3	D	33.8	++	-8.0	D		
Hs.199850	Dachsous 1 (Drosophila)	DCHS1	33.0	-	61.8	-	2.0	I	58.4	-	1.7	I	58.2	-	95.5	-	1.7	I	48.4	-	1.1	NC		
Hs.292156	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	DKK3	44.1	-	125.9	++	2.1	I	28.3	-	-1.2	NC	55.8	-	161.9	++	2.8	I	103.3	++	1.8	I		
Hs.5158	integrin-linked kinase	ILK	304.9	-	328.8	+	1.1	NC	307.1	-	-1.1	NC	360.4	-	216.6	-	-1.3	D	147.9	-	-2.1	D		
Hs.167451	KIAA0999 protein	KIAA0999	111.0	++	101.6	++	-1.6	NC	98.4	++	1.1	NC	65.2	++	62.5	++	-1.7	NC	126.3	++	2.0	I		
Hs.144468	hypothetical protein MGC3234	MGC3234	223.3	-	161.6	++	-1.9	NC	220.4	-	-1.2	NC	235.5	-	96.8	-	-2.1	D	96.9	-	-1.9	D		
Hs.503911	Nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	36.9	-	52.2	-	1.1	NC	52.6	-	1.5	NC	31.1	++	67.2	++	2.1	NC	124.1	++	4.6	I		
Hs.445081	NS5ATP13TP2 protein	NS5ATP13TP2	760.2	++	710.8	++	1.0	NC	550.3	++	-1.1	NC	996.8	++	525.2	+	-1.9	D	383.9	++	-2.6	D		
Hs.436319	parvin, alpha	PARVA	122.4	-	121.6	-	1.3	NC	76.4	-	-1.2	NC	100.3	+	256.1	++	2.5	I	232.3	+	2.1	I		
Hs.443752	Protein convertase subtilisin/kexin type 7	PCSK7	246.0	-	95.0	-	-2.1	NC	150.4	-	-1.6	NC	241.9	-	102.4	-	-2.0	D	192.6	-	-1.2	NC		
Hs.374726	PDZ domain containing 2	PDZK2	233.4	-	149.3	-	-1.4	NC	272.0	-	1.1	NC	217.7	-	61.0	-	-3.2	D	25.8	-	-6.1	MD		
Hs.434044	protein kinase C, delta binding protein	PRKCDBP	54.7	-	45.4	-	1.1	NC	34.9	-	-1.2	NC	39.8	-	57.5	-	1.1	NC	74.6	-	2.0	I		
Hs.523463	Hypothetical protein MGC10850	RPL27A	199.6	++	244.2	++	1.6	I	126.2	++	1.1	NC	146.8	++	573.5	++	4.9	I	120.0	++	1.4	NC		
Hs.300076	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1-like 1a	SLC22A1LS	146.7	-	101.4	-	-2.1	MD	124.8	-	-1.4	NC	173.0	-	90.3	-	-1.7	D	151.8	-	-1.1	NC		
Hs.132760	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 1	SLC37A4	229.5	++	99.2	++	-1.9	D	310.5	++	1.4	I	184.1	++	27.7	-	-4.3	D	7.1	-	-18.4	D		
Hs.26899	transmembrane protein 24	TMEM24	160.5	-	100.2	-	-1.5	NC	165.5	-	-1.4	NC	152.0	-	77.6	-	-1.6	NC	36.6	-	-3.5	D		
Hs.368527	toll interacting protein	TOLLIP	43.6	-	26.8	-	-2.0	D	49.0	-	1.0	NC	14.7	-	2.3	-	-5.7	NC	14.1	-	-2.1	NC		
Hs.503891	ubiquitin specific protease 28	USP28	158.2	-	250.7	+	1.9	NC	129.8	++	1.2	NC	120.3	++	350.9	++	1.7	I	188.6	++	2.5	I		
Hs.534332	mucin 5 subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	MUC5AC	85.0	-	1.2	-	-32.0	D	4.5	-	-1.3	D	32.2	-	1.3	-	-9.8	D	20.9	-	-1.9	NC		
Hs.368527	toll interacting protein	TOLLIP	43.6	-	26.8	-	-2.0	D	49.0	-	1.0	NC	14.7	-	2.3	-	-5.7	NC	14.1	-	-2.1	NC		
Hs.41688	dual specificity phosphatase 8	DUSP8	82.2	++	87.4	-	1.1	NC	87.0	-	1.1	NC	67.8	-	44.7	-	-1.4	NC	21.8	-	-2.8	D		
Hs.3254	mitochondrial ribosomal protein L23	MRPL23	154.7	++	123.3	++	-1.1	NC	150.9	++	-1.1	NC	204.6	++	101.1	++	-1.7	D	46.9	++	-4.0	D		
Hs.56729	lymphocyte-specific protein 1	LSP1	124.7	-	42.5	-	-2.6	D	123.4	-	1.1	NC	94.6	-	36.8	-	-2.3	D	48.3	-	-1.9	NC		
Hs.144468	hypothetical protein MGC3234	MGC3234	223.3	-	161.6	++	-1.9	NC	220.4	-	-1.2	NC	235.5	++	96.8	-	-2.1	D	96.9	-	-1.9	D		
Hs.534332	mucin 5 subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	MUC5AC	85.0	-	1.2	-	-32.0	D	4.5	-	-1.3	D	32.2	-	1.3	-	-9.8	D	20.9	-	-1.9	NC		
Hs.523463	Hypothetical protein MGC10850	RPL27A	199.6	++	244.2	++	1.6	I	126.2	++	1.1	NC	146.8	++	573.5	++	4.9	I	120.0	++	1.4	NC		
Hs.414418	blocked early in transport 1 homolog (S. cerevisiae) like	BET1L	495.5	-	415.2	++	-1.2	NC	520.0	++	1.1	NC	691.5	++	189.3	++	-2.3	D	426.6	++	-1.4	NC		
Hs.502328	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	CD44	552.9	++	485.0	++	1.1	NC	567.3	++	1.1	I	397.5	++	548.0	++	1.6	NC	709.8	++	2.0	I		
Hs.278573	CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 1)	CD59	744.8	++	311.1	++	-2.1	D	356.4	++	-1.9	D	664.9	++	566.7	++	-1.3	NC	1503.9	++	1.6	I		
Hs.438794	SET binding factor 2	SFB2	201.9	-	295.6	+	1.5	NC	188.3	++	-1.1	NC	175.1	++	523.3	+	2.5	I	279.2	++	1.5	NC		
Hs.268664	hypothetical protein FLJ39441	FLJ39441	126.1	-	272.3	-	1.2	NC	293.4	-	-1.1	NC	140.8	-	402.2	-	2.0	I	197.8	-	1.1	NC		
Hs.502306	Ets homolog factor	EHF	227.2	-	1808.7	++	-1.4	D	1080.1	++	-2.1	D	3239.2	++	3922.1	++	1.2	NC	4674.6	++	1.4	I		
Hs.55016	EPS8-like 2	EPS8L2	409.2	++	368.8	-	1.1	NC	434.0	++	1.1	NC	424.0	++	185.8	++	-2.1	D	234.2	++	-1.6	D		
Hs.353181	hypothetical protein FLJ2635	FLJ2635	121.7	-	94.6	-	-1.2	NC	159.3	++	1.2	I	72.0	-	45.7	-	-1.9	D	37.0	-	-2.3	MD		
Hs.268664	hypothetical protein FLJ39441	FLJ39441	126.1	-	272.3	-	1.2	NC	293.4	-	-1.1	NC	140.8	-	402.2	-	2.0	I	197.8	-	1.1	NC		
Hs.135665	growth arrest-specific 2	GAS2	12.3	-	28.7	+	2.1	I	10.7	-	1.0	NC	3.9	-	13.0	-	3.0	NC	9.1	-	1.6	I		
Hs.37003	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	HRAS	50.3	-	39.1	-	-1.5	NC	66.4	-	-1.1	NC	72.5	++	33.7	-	-2.1	D	39.1	-	-1.7	NC		
Hs.458414	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	IFITM1	917.9	++	1028.9	++	1.2	NC	947.5	++	1.1	NC	771.3	++	1150.6	++	2.0	I	1209.7	++	1.9	I		
Hs.166120	interferon regulatory factor 7	IRF7	134.5	++	88.7	-	-1.2	NC	112.8	-	-1.1	NC	95.0	++	44.3	-	-2.0	D	84.5	-	1.1	NC		
Hs.325838	CTD-binding SR-like protein r9	KIAA1542	114.6	++	88.0	++	-1.5	NC	138.3	-	1.0	NC	141.3	++	52.4	-	-2.0	NC	35.1	-	-2.6	D		
Hs.301052	kinesin family member 18A III / kinesin family member 18A	KIF18A	11.3	-	9.0	-	-1.5	NC	11.4	-	-1.3	NC	10.2	-	21.0	-	1.5	NC	25.2	-	2.5	MI		
Hs.502176	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4	LGR4	67.3	-	162.2	-	2.0	I	131.0	++	1.9	I	121.5	++	205.2	++	1.7	I	177.4	++	1.7	I		
Hs.280990	novel 58 KDa protein	LOC91614	309.7	++	322.7	-	1.0	NC	366.0	++	1.1	I	175.3	++	168.8	++	-1.1	NC	80.4	++	-2.5	D		
Hs.315	mucin 1, intestinal/tracheal	MUC1	2529.8	++	1599.1	++	-1.6	D	2117.5	++	1.2	NC	2322.5	++	910.8	++	-2.5	D	550.2	++	-4.3	D		
Hs.534332	mucin 5 subtypes A and C, tracheobronchial/gastric	MUC5AC	85.0	-	1.2	-	-32.0	D	4.5	-	-1.3	D	32.2	-	1.3	-	-9.8	D	20.9	-	-1.9	NC		
Hs.165619	mucin and cadherin-like	MUCDH1	1147.2	++	675.9	++	-1.6	D	1387.3	++	1.1	NC	884.3	++	140.0	-	-3.7	D	69.4	-	-8.0	D		
Hs.175343	Phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide	PIK3CA2	510.8	-	345.9	++	-1.6	NC	289.4	++	-1.5	D	340.5	++	226.5	++	-1.7	D	114.6	-	-4.9	D		
Hs.534395	plakophilin 3	PKP3	445.5	++	239.3	-	-2.0	D	289.1	-	-1.6	NC	566.4	++	204.2	-	-2.8	D	111.4	-	-3.7	D		
Hs.118463	patatin-like phospholipase domain containing 2	PNPLA2	130.9	-	37.3	-	-2.1	D	100.4	-	-1.2	NC	85.0	++	45.8	-	-2.1	D	51.7	-	-1.9	D		
Hs.437594	ribosomal protein, large, P2	RPLP2	2908.2	++	1536.3	++	-2.0	D	2345.6	++	1.1	NC	2478.1	++	1413.7	++	-1.6	D	2148.3	++	-1.1	NC		
Hs.332053	serum amyloid A1	SA1A	7.2	-	3.5	-	-1.5	NC	3.1	-	-1.6	NC	1.9	-	18.5	-	9.2	NC	95.2	-	16.0	I		
Hs.148907	Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12	SLC5A12	156.7	++	238.4	-	1.3	NC	204.6	++	1.1	NC	70.4	-	74.4	-	1.0	NC	10.4	-	-4.0	I		
Hs.501622	tumor protein p53 inducible protein 5	TP53I5	488.6	++	439.0	++	-1.4	D	619.6	++	1.0	NC	665.1	++	340.0	-	-2.3	D	266.8	++	-2.6	D		
Hs.292156	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	DKK3	44.1	-	125.9	-	2.1	I	28.3	-	-1.2	NC	56.8	-	161.9	-	2.8	I	103.3	++	1.6	I		
Hs.174195	interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	IFITM2	493.9	++	437.3	-	-1.2	NC	530.6	++	1.1	NC	11.1	++	494.8	++	52.7	++	-1.1	NC	1108.7	++	2.0	I
Hs.523395	mucin 5 subtype B, tracheobronchial	MUC5B	72.5	-	2.3	-	-27.9	D	4.1	-	-1.4	D	376.5	+										

UniGene	Symbol	Co_ileum_Sig	Co_ileum_P	CD_ileum_Sig	CD_ileum_P	CD_ileum_Fc	CD_ileum_Ch	UC_ileum_Sig	UC_ileum_P	UC_ileum_Fc	UC_ileum_Ch	Co_colon_Sig	Co_colon_P	CD_colon_Fc	CD_colon_Ch	UC_colon_Sig	UC_colon_P	UC_colon_Fc	UC_colon_Ch		
Hs_454581	hypothetical protein MGC40069	MGC40069	23.3	-	15.8	+	-1.6	NC	17.1	-	1.1	NC	29.1	+	10.4	-	-4.0	NC	1.1	-	-13.9
Hs_525205	NDRG family member 2	NDRG2	295.7	+	228.2	+	-1.9	D	240.4	+	-1.5	NC	419.9	+	280.3	+	-1.3	D	98.3	-	-2.6
Hs_117176	poly(A) binding protein, nuclear 1	PABPN1	861.7	++	699.8	++	-1.1	NC	671.2	++	-1.1	NC	884.2	++	571.0	++	-1.1	NC	332.2	++	-2.0
Hs_75812	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	PCK2	719.9	++	861.2	++	-1.1	NC	921.3	++	1.1	NC	605.5	++	261.6	++	-2.8	D	275.2	++	-2.8
Hs_377992	Rab geranylgeranyltransferase, alpha subunit	RABGGTA	84.2	++	92.4	++	-1.4	NC	84.2	++	-1.2	NC	92.6	++	33.8	+	-2.1	D	38.6	++	-2.3
Hs_78224	ribonuclease, RNase A family, 1 (pancreatic)	RNASE1	605.3	++	481.7	++	-1.7	D	471.1	++	-1.5	D	752.2	++	534.2	++	-2.3	D	594.1	++	-1.3
Hs_283749	ribonuclease, RNase A family, 4	RNASE4	153.1	++	380.8	++	2.0	NC	255.2	++	1.4	NC	172.7	++	386.5	++	2.0	NC	309.6	++	1.4
Hs_367854	SKB1 homolog (S. pombe)	SKB1	109.2	+	40.1	-	-1.7	NC	88.1	-	-1.1	NC	174.2	++	66.5	-	-2.0	D	74.9	+	-1.9
Hs_513147	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), n	SLC7A7	647.1	++	1455.6	++	-1.5	NC	1271.1	++	1.3	NC	451.3	++	367.8	++	-1.2	D	297.5	++	-2.3
Hs_508958	synapsin binding protein 6 (amisyn)	STXBP6	171.6	++	283.5	++	-1.7	NC	168.3	++	1.0	NC	163.6	++	318.5	++	2.1	NC	168.6	++	1.1
0	16p13.1-p13.3 (markers:D16S415; D16S407) (genes in locus:61)																				
Hs_512607	membrane interacting protein of RGS16	MIR16	200.8	+	119.4	++	-1.7	D	183.8	++	-1.1	NC	277.0	++	92.3	++	-3.0	D	206.7	++	-1.2
Hs_528301	endoplasmic reticulum to nucleus signalling 2	ERN2	157.7	++	71.2	+	-2.0	D	136.7	+	-1.3	NC	121.9	++	113.9	++	-1.2	NC	209.7	++	1.1
Hs_145717	Hypothetical protein FLJ13798	FLJ13798	145.8	-	62.0	+	-1.4	NC	78.9	+	-1.1	NC	92.6	-	40.0	-	-2.0	NC	19.6	-	-4.6
Hs_459855	phosphomannomutase 2	PM2M	101.4	++	73.5	++	-1.3	NC	64.2	++	-1.7	NC	151.5	++	56.1	++	-2.6	MD	81.5	++	-1.6
Hs_336768	4-aminobutyrate aminotransferase	ABAT	38.6	++	181.8	++	-3.2	NC	90.1	++	1.7	NC	42.2	++	167.4	++	3.5	NC	63.9	++	1.3
Hs_164118	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	SLC5A11	146.3	+	182.4	++	-1.2	NC	152.5	++	1.3	NC	85.8	+	19.6	-	-4.0	D	5.9	-	-8.6
Hs_411472	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl-D-aspartate 2A	GRIN2A	23.9	+	22.0	-	1.0	NC	14.7	-	1.1	NC	2.4	-	29.3	-	9.8	NC	26.7	-	13.0
Hs_176658	aquaporin 8	AQP8	574.7	++	39.0	-	-8.6	D	58.2	-	-9.8	D	437.9	++	1595.0	++	4.3	NC	886.6	++	3.0
Hs_2556	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	TNFRSF17	77.7	+	57.1	-	-1.2	NC	58.3	-	-1.4	NC	62.8	-	109.0	++	2.0	NC	108.4	++	1.9
Hs_433391	metallothionein 1G	MT1G	3052.5	++	2657.5	++	-1.1	NC	3727.8	++	1.2	NC	2355.7	++	996.9	++	-1.7	D	1089.4	++	-2.0
Hs_416164	sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (Liddle syndrome)	SCNN1B	54.7	-	8.0	-	-7.5	MD	6.1	-	-9.2	D	115.5	+	91.6	+	-1.3	NC	57.5	+	-1.7
Hs_459940	lipopolysaccharide-induced TNF factor	LITAF	500.3	++	412.4	++	-1.2	NC	357.4	++	-1.2	NC	669.9	++	1213.3	++	1.9	NC	1481.5	++	2.1
Hs_460355	Protein kinase C, beta 1	PRKCB1	157.1	++	76.5	++	-2.0	D	203.8	++	1.4	MD	95.3	++	104.0	++	1.1	NC	76.2	++	-1.2
Hs_386939	ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)	USP7	184.4	++	334.0	++	1.6	NC	175.8	++	-1.3	NC	192.0	++	437.6	++	2.0	NC	187.6	++	-1.1
0	16p11-q21 (BD1) (markers:D16S769; D16S408; D16S419; D16S409 to D16S411) (genes in locus:16)																				
Hs_513617	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa)	MMP2	266.7	++	500.3	++	-1.5	NC	264.8	++	-1.1	NC	220.3	++	522.4	++	1.5	NC	1050.4	++	3.7
Hs_530936	Chromodomain helicase DNA binding protein 9	CHD9	295.5	++	422.8	++	-1.6	NC	273.6	++	1.3	NC	160.2	++	507.0	++	2.5	NC	293.2	++	1.5
Hs_200821	Plasma membrane proteolipid (plasmolipin)	TM4SF11	194.4	++	259.2	++	-1.3	MD	205.4	++	1.0	NC	150.6	++	58.3	++	-2.1	MD	100.6	++	-1.7
Hs_276678	hucleopin 93Da	NUP93	57.2	-	36.4	-	-1.4	NC	33.2	-	-1.9	NC	91.0	+	20.3	-	-4.3	D	89.4	+	1.1
Hs_513578	adenylate cyclase 7	ADCY7	33.1	+	36.9	+	-1.4	NC	67.4	+	2.0	NC	32.9	+	49.2	+	1.6	NC	40.3	++	1.5
Hs_295923	seven in absentia homolog 1 (Drosophila)	SIAH1	207.5	++	307.5	++	-1.6	NC	206.3	++	1.2	NC	155.7	++	371.4	++	3.5	NC	212.8	++	1.3
Hs_433391	metallothionein 1G	MT1G	3052.5	++	2657.5	++	-1.1	NC	3727.8	++	1.2	NC	2355.7	++	996.9	++	-1.7	D	1089.4	++	-2.0
Hs_440406	Neuropilin (NRP) and tollip (TLL)-like 2	NETO2	48.6	++	33.7	++	-1.6	NC	39.9	-	-1.7	NC	61.2	++	203.1	++	2.5	NC	76.7	++	1.4
Hs_80343	matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)	MMP15	169.6	++	147.4	++	-1.0	NC	123.7	++	-1.1	NC	182.8	++	64.1	+	-2.6	D	85.9	+	-1.4
Hs_513490	aldolase A, fructose-bisphosphate	ALDOA	226.1	++	1181.1	++	-2.0	D	1650.4	++	1.4	D	2343.5	++	1752.2	++	-1.6	NC	2163.0	++	-1.1
Hs_176658	aquaporin 8	AQP8	574.7	++	39.0	-	-8.6	D	58.2	-	-9.8	D	437.9	++	1595.0	++	4.3	NC	886.6	++	3.0
Hs_96023	CD19 antigen	CD19	191.9	+	30.3	-	-5.7	D	290.6	++	1.3	NC	113.0	+	58.7	-	-1.6	D	88.5	+	-1.3
Hs_446747	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3, juvenile (Batten, Spielmeyer-Vogt)	CLN3	305.9	+	131.3	+	-1.9	D	188.5	+	-1.3	NC	347.4	++	180.9	+	-2.5	D	111.3	+	-2.6
Hs_185807	component of oligomeric golgi complex 7	COG7	73.4	++	36.5	-	-2.0	D	40.8	+	-1.9	D	72.5	++	28.1	-	-1.9	D	24.8	+	-2.3
Hs_226301	endoplasmic reticulum to nucleus signalling 2	ERN2	157.7	++	71.2	+	-2.0	D	136.7	+	-1.3	NC	121.9	++	113.9	++	-1.2	NC	209.7	++	1.1
Hs_145717	Hypothetical protein FLJ13798	FLJ13798	145.8	-	62.0	+	-1.4	NC	78.9	-	-1.1	NC	92.6	-	40.0	-	-2.0	NC	19.6	-	-4.6
Hs_434864	hypothetical protein FLJ90652	FLJ90652	416.9	++	187.1	++	-1.9	D	387.0	++	1.0	NC	434.1	++	142.2	++	-2.1	D	101.5	++	-3.2
Hs_119324	kinesin family member 22	KIF22	60.6	++	42.6	++	-1.7	NC	33.9	-	-1.5	NC	64.2	++	61.8	+	-1.5	NC	35.4	++	-2.0
Hs_444600	LAT1-3TM protein	LAT1-3TM	117.1	++	151.1	++	-1.5	NC	122.1	++	-1.1	NC	176.8	++	530.2	++	2.8	NC	306.8	++	1.7
Hs_374950	metallothionein 1X	MT1X	2696.1	++	315.2	++	-1.1	NC	3043.2	++	1.2	NC	2038.6	++	983.9	++	-1.9	D	975.0	++	-2.1
Hs_513463	p8 protein (candidate of metastasis 1)	P8	76.5	+	28.5	-	-2.3	D	53.8	+	-1.6	D	140.8	++	64.3	+	-2.3	D	115.1	++	-1.5
Hs_534338	protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	PPP4C	223.7	+	93.2	-	-2.3	D	217.8	+	-1.3	NC	163.6	+	110.1	-	-1.7	D	133.8	+	-1.3
Hs_460355	Protein kinase C, beta 1	PRKCB1	157.1	++	76.5	++	-2.0	D	203.8	++	1.4	MD	95.3	++	104.0	++	1.1	NC	76.2	++	-1.2
Hs_513484	quinolinate phosphoribosyltransferase (nicotinate-nucleotide pyrophosphoryl transferase)	QPR7	81.9	+	105.1	++	-1.5	NC	186.1	++	1.5	NC	55.7	+	49.4	+	-1.4	NC	52.3	+	-1.1
Hs_414614	sodium channel, nonvoltage-gated 1, beta (Liddle syndrome)	SCNN1B	54.7	-	8.0	-	-7.5	MD	6.1	-	-9.2	D	115.5	++	91.6	+	-1.3	NC	57.5	+	-1.7
Hs_371727	sodium channel, nonvoltage-gated 1, gamma	SCNN1G	0.7	-	2.4	-	1.3	NC	1.6	-	1.2	NC	113.7	++	1.0	-	-32.0	D	15.6	-	-4.9
Hs_164118	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 11	SLC5A11	146.3	+	182.4	++	-1.2	NC	152.5	++	1.3	NC	85.8	+	19.8	-	-4.0	D	5.9	-	-8.6
Hs_513491	yippee-like 3 (Drosophila)	YPEL3	691.3	++	559.6	++	-1.3	NC	736.9	++	1.1	NC	455.0	+	232.2	+	-2.1	D	267.6	+	-1.7
0	19p13-q13 (BD6) (markers:D19S217; D19S178; D19S425; D19S591 to D19S1034) (genes in locus:381)																				
Hs_423756	srinu (silent mating type information regulation 2 homolog) 6 (S. cerevisiae)	SIR6	199.3	-	78.2	-	-2.0	D	210.8	+	1.1	NC	254.7	++	149.2	+	-1.3	D	179.2	-	-1.3
Hs_11099	spERMatozoa associated 11	SPATA11	480.5	++	377.8	++	-1.3	NC	466.3	++	1.0	NC	650.5	++	236.4	++	-2.3	D	230.9	++	-2.0
Hs_515053	Amino-terminal enhancer of split	AES	222.3	++	65.4	++	-2.1	D	189.9	+	-1.1	NC	256.8	++	88.9	++	-2.5	D	66.9	+	-2.3
H																					

UniGene	Title	Symbol	Co_leum_Sig	Co_leum_p	CD_leum_Sig	CD_leum_p	CD_leum_Fc	CD_leum_Ch	UC_leum_Sig	UC_leum_p	UC_leum_Fc	UC_leum_Ch	Co_colon_Sig	Co_colon_p	CD_colon_Fc	CD_colon_Ch	UC_colon_Sig	UC_colon_p	UC_colon_Fc	UC_colon_Ch		
Hs.466849	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 6	PSG6	79.4	++	37.2	-	-2.1	D	44.1	-	-1.7	D	71.7	++	77.6	+	-1.4	NC	48.2	-	-2.0	NC
Hs.78466	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	PSMD8	333.3	++	245.2	++	-1.3	NC	319.3	++	-1.2	NC	377.5	++	133.1	++	-2.6	D	270.5	++	-1.2	NC
Hs.326371	Poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)	PVRL2	157.6	++	101.4	+	-1.6	D	167.5	++	-1.3	NC	263.8	++	93.4	+	-2.3	D	5.5	-	-13.0	D
Hs.11417	Rab acceptor 1 (prenylated)	RABAC1	434.0	++	235.6	++	-1.7	D	372.7	++	-1.1	NC	465.3	++	198.3	++	-2.6	D	248.1	++	-2.0	D
Hs.307905	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor (RELB)	RELB	79.2	-	105.2	+	1.1	NC	82.2	+	1.1	NC	72.1	+	61.5	-	-1.3	NC	32.7	-	-2.3	D
Hs.515494	Solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	SLC1A5	87.8	++	57.2	++	-1.3	NC	76.3	++	1.1	NC	164.3	++	65.3	+	-1.6	D	35.2	+	-3.0	D
Hs.408567	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 1	SLC7A9	1741.4	++	2450.7	++	1.5	NC	2378.7	++	1.3	NC	1137.3	++	417.7	++	-2.5	D	134.6	++	-10.6	D
Hs.466775	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A	SNRPA	244.1	++	169.5	+	-1.6	D	227.3	++	-1.1	NC	305.0	++	213.0	+	-1.6	D	92.2	-	-2.5	D
Hs.515475	symplekin	SYMPK	36.3	-	32.1	+	-1.3	NC	26.5	-	1.0	NC	31.8	-	30.0	-	-1.1	NC	3.8	-	-10.6	D
Hs.1103	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)	TGFB1	62.2	+	46.4	+	-1.6	NC	83.3	++	1.4	NC	73.5	+	44.5	-	-1.5	D	14.6	-	-3.7	D
Hs.515469	vasodilator-stimulated phosphoprotein	VASP	184.0	++	111.6	++	-1.5	MD	164.1	++	-1.1	NC	182.3	++	130.3	++	-1.7	NC	32.5	-	-4.0	D
Hs.280741	Yip1 interacting factor homolog B (S. cerevisiae)	YIF1B	226.3	-	114.4	-	-2.0	D	180.0	-	-1.1	NC	271.4	-	160.5	-	-1.7	D	189.3	+	-1.7	NC
Hs.290703	zinc finger protein 573	ZNF573	14.0	+	29.7	++	1.5	NC	14.4	+	-1.1	NC	13.8	+	30.2	++	2.3	NC	9.8	++	-1.1	NC
0	22q11-12 (markers:D22S315 to D22S421) (genes in locus:1 / genes on chip:1)																					
0	Xp22-p21 (markers:DXS1226 to DXS1214) (genes in locus:25)																					
Hs.495912	dystrophin (muscular dystrophy, Duchenne and Becker types)	DMD	27.4	+	55.4	++	2.3	NC	36.4	++	1.5	MI	29.1	++	56.2	++	2.0	NC	50.2	++	1.4	NC
Hs.1466	glycerol kinase	GK	87.1	-	212.6	+	2.1	NC	126.8	+	1.5	NC	40.3	++	102.7	++	2.1	NC	70.1	++	1.1	NC
Hs.83383	peroxiredoxin 4	PRDX4	271.1	++	344.0	++	1.2	NC	297.9	++	1.1	NC	369.8	++	489.5	++	1.3	NC	1050.5	++	2.8	NC
0	Xq23-q25 (markers:DXS1001 to DXS1047) (genes in locus:15)																					
Hs.61469	chromosome X open reading frame 9	CXorf9	221.5	++	144.3	++	-2.1	D	203.0	++	1.1	NC	96.0	++	119.7	++	1.0	NC	94.9	++	1.1	NC
Hs.368538	glutamate dehydrogenase 2	GLUD2	132.4	++	75.1	++	-1.9	D	134.8	++	1.0	NC	110.7	++	39.9	++	-3.0	D	61.4	++	-1.9	D
Hs.349094	SH2 domain protein 1A, Duncan's disease / lymphoproliferative syndrome	SH2D1A	4.2	-	11.6	-	2.8	NC	29.0	++	7.0	NC	10.6	-	5.0	-	-2.1	NC	15.6	+	-1.1	NC
Hs.170499	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound	XPNPEP2	1019.0	++	1070.1	++	1.1	NC	1531.0	++	1.5	NC	516.0	++	90.0	++	-7.0	D	54.4	+	-10.6	D
Hs.193566	zinc finger, DHHC-type containing 9	ZDHHC9	463.0	+	785.0	++	1.6	NC	366.6	+	-1.1	NC	444.3	+	373.8	+	-1.1	NC	38.9	-	-4.6	D

Bei CED differentiell regulierte Gene, die in bekannten CED Kandidatenloci lokalisiert sind. Neben dem Expressionssignal sind weiterhin der *detection p-value* und bei den Patientenkollektiven zusätzlich der *fold change* der Genexpression sowie der *change call*, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, angegeben. FC, *fold change*; Sig, Expressionssignal; p, *detection p-value*, Ch, *change call*, Co, Kontrollprobanden; CD, Morbus Crohn; UC, Colitis ulcerosa

Anschließend wurden die bei CED differentiell regulierten Kandidatenloci Gene ebenfalls der biomedizinischen Pathway Analyse (ausführlich in Kapitel 4.3) unterzogen, um nähere Aussagen bezüglich ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten biologischen Prozessen oder Funktionen zu erhalten. Dazu wurden die 476 dysregulierten Gene auf die Synopsis abgebildet und biostatistisch ausgewertet. Anschließend wurden die 73 einzelnen Kategorien zu insgesamt 16 Überkategorien zusammengefasst und das Ergebnis in Tabelle 13 dargestellt. Die prozentual am höchsten repräsentierten Kategorien waren vesikulärer Transport (6,4%), Entzündung (6,3%) transkriptionelle Regulation (6,0%) und extrazelluläre Matrix (5,9%). Eine hohe Zahl an differentiell regulierten Genen zeigten außerdem der Energiestoffwechsel (101 differentiell regulierte Gene), der Lipid Metabolismus (33), die Kinasen/Phosphatasen (22), die Proteine der Transkription/Translation (27) und die Calcium Signalkaskade (20). Die hohe Gesamtzahl an Genen in diesen Kategorien bewirkt einen niedrigen Prozentwert. Auffallend dabei ist, dass es sich um dieselben Kategorien wie bei der Pathway Analyse aller bei CED differentiell regulierten Gene (Kapitel 4.3) handelt. Beide Ergebnisse passen gut zur derzeitigen Modellvorstellung der Pathogenese von CED, mit einer chronischen Entzündung ausgelöst durch eine verminderte Barriere Funktion der extrazellulären Matrix.

Tabelle 13 Pathway bezogene Auswertung von bei CED differentiell regulierten Genen lokalisiert in CED Kandidatenloci

ID	Category	no. of genes in category	no. of genes in IBD loci	%
1	Vesicular trafficking / traffic	4407	282	6,4%
2	Cytokines / chemokines / inflammation	937	59	6,3%
3	Transcriptional regulation	2643	159	6,0%
4	ECM / adhesion / intestinal epithelial differentiation	1854	110	5,9%
5	Muscle Cell Metabolism	1763	92	5,2%
6	Diseases	7442	376	5,1%
7	Energy metabolism / apoptosis / glucose	2251	101	4,5%
8	Lipid metabolism	756	33	4,4%
9	Detoxification	221	9	4,1%
10	Glykosylation / sialation / CTP / UTP / GTP / ITP	235	8	3,4%
11	Kinases / phosphatases	648	22	3,4%
12	Placenta / prostate / sperm / testes	213	7	3,3%
13	Transcription / translation	856	27	3,2%
14	Phosphatidylinositol / Ca++ signalling / GPRs	703	20	2,8%
15	not yet classified to pathways	2806	45	1,6%
16	unknowns	3972	32	0,8%

Für jede der 16 Kategorien (Category) ist jeweils die Anzahl der insgesamt enthaltenen Gene (no. of genes in category), die Anzahl der bei CED differentiell regulierten Kandidatenloci Gene und das prozentuale Verhältnis (%) dargestellt. *ECM*, extrazelluläre Matrix; *IBD*, CED

In einem weiteren Ansatz wurden alle 3367 Gene aus den CED Kandidatenloci, unabhängig von ihrer jeweiligen chromosomal Lokalisation und Regulation bei CED, mit dem TRANSPATH™ Programm der Firma BIOBASE GmbH (<http://www.biobase.de>) analysiert. Ziel war es alle an Regulationsvorgängen beteiligten Gene und deren Zugehörigkeit zu regulatorischen Netzwerken zu identifizieren. Dazu wurden innerhalb der CED Kandidatenloci Gene zuerst alle Transkriptionsfaktoren und an Signaltransduktionsvorgängen beteiligte Gene ermittelt. Diese wurden auf die in der TRANSPATH™ Datenbank vorhandenen Signalkaskaden abgebildet und ausgewertet. Die meisten regulatorischen CED Kandidatenloci Gene waren in den folgenden fünf Pathways vertreten: *protein kinase*, *cAMP-dependent, catalytic (PKA)/protein kinase C*, *delta (PKC)*, *tumor protein p53 (TP53)*, *calmodulin (CAM)* und *phosphatidylinositol lipid*. Tabelle 14 enthält in Spalte eins die nach ihrer biologischen Funktion gruppierten regulatorischen Kandidatenloci Gene, in Spalte zwei die funktionelle Klassifizierung des TRANSPATH™ Programms und in Spalte drei bis fünf die identifizierten Signalkaskaden. Ein Eintrag in der Pathway Spalte zeigt die Zugehörigkeit des Gens zur jeweiligen Signalkaskade. Das Ergebnis für die TP53 Signalkaskade ist nicht dargestellt.

Tabelle 14 TRANSPATH™ Analyse von regulatorischen Genen lokalisiert in CED Kandidatenloci

Symbol	Functional Class	Calmodulin	Phosphatidyl-inositol / lipids	PKC / PKA
0	Receptors			
LRP1	membrane-transducing components; receptors; LRP; LRP1.		LRP1(h)	
MST1R	membrane-transducing components; receptors; RTK; Met family; RON		RON(h)	
SLC9A1	membrane-transducing components; ion channels; sodium channels; NHE	NHE-1(h)	NHE-1(h)	
0	G-protein coupled receptors / G-proteins			
C5R1	membrane-transducing components; receptors; GPCR; rhodopsin like receptors	C5aR(h)	C5aR(h)	
CHRM3	membrane-transducing components; receptors; GPCR; rhodopsin like receptors	M3(h)	M3(h)	
GRIN2B	membrane-transducing components; receptors; GPCR; metabotropic glut		GRIN2B(h)	
OPRM1	membrane-transducing components; receptors; GPCR; rhodopsin like receptors		MOR(h)	MOR(h)
TBXA2R	membrane-transducing components; receptors; GPCR; rhodopsin like re	TPbeta(h)	TPbeta(h)	
GNA11	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; G-alpha; G-alpha-q		G-alpha-11(h)	
GNA15	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; G-alpha; G-alpha-q		G-alpha-15(h)	
GNA11	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; G-alpha; G-alpha-i		G-alpha-i-1(h)	G-alpha-i-1(h)
GNA12	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; G-alpha; G-alpha-i		G-alpha-i-2(h)	G-alpha-i-2(h)
GNAO1	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; G-alpha; G-alpha-i		G-alpha-o-1(h)	G-alpha-o-1(h)
HSPA1A	chaperones; Hsp; Hsp70 family; Hsp70; Hsp70(h) (main classification		Hsp70-1(h)	
HSPB1	chaperones; Hsp; Hsp27 (main classification) <splitfield> chaperone		Hsp27(h)	Hsp27(h)
YWHAH	inhibitors; intracellular inhibitors; cytosolic chaperonin proteins		14-3-3gamma(h)	
SFN	inhibitors; intracellular inhibitors; cytosolic chaperonin proteins	14-3-3sigma(h)	14-3-3sigma(h)	
ARHGAP21	GTPase-controlling signal molecules; GAP; RhoGAP; Graf family; Graf		Graf2(h)	
RAP1GA1	GTPase-controlling signal molecules; GAP; Rap1-GAP.		Rap1GAP(h)	Rap1GAP(h)
ARHGEF1	GTPase-controlling signal molecules; GEF; RhoGEF (main classificati	RhoGEF(h)	RhoGEF(h)	RhoGEF(h)
CHC1	GTPase-controlling signal molecules; GEF; RCC1.	RCC1(h)	RCC1(h)	RCC1(h)
ECT2	GTPase-controlling signal molecules; GEF; ECT2.	ECT2(h)	ECT2(h)	ECT2(h)
RAP1GDS1	GTPase-controlling signal molecules; GEF; SmgGDS.	SmgGDS(h)	SmgGDS(h)	SmgGDS(h)
ARHGDI	GTPase-controlling signal molecules; GDIs; RhoGDI-2.		RhoGDI-2(h)	
CDC42	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; small G-proteins;	Cdc42(h)	Cdc42(h)	
RAB4B	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; small G-proteins;	Rab4B(h)	Rab4B(h)	
RHOA	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; small G-proteins; Rho fami	RhoA(h)	RhoA(h)	
RHOG	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; small G-proteins; Rho fami	RhoG(h)	RhoG(h)	
RRAS2	GTPase-controlling signal molecules; G-proteins; small G-proteins; Ras fami		TC21(h)	
FZR1	co-factors; Fzr; Fzr1.		Fzr1(h)	
0	Adaptor Proteins			
CBL	proto-oncogene; c-Cbl <splitfield> adaptor proteins; CBL family; c-	c-Cbl(h)	c-Cbl(h)	c-Cbl(h)
BAK1	adaptor proteins; Bcl-2 family; Bak.	Bak(h)	Bak(h)	
DAXX	adaptor proteins; Daxx <splitfield> transcription factors; Daxx.		Daxx(h)	
HIP1	adaptor proteins; Hip-1.		Hip-1(h)	
LAT	adaptor proteins; LAT.		LAT(h)	
MAP2K1IP1	adaptor proteins; MP1.		MP1(h)	
MVP	adaptor proteins; MVP.		MVP(h)	
NCKIPSD	adaptor proteins; SPIN90.		SPIN90(h)	
VASP	cytoskeletal proteins; VASP.	VASP(h)	VASP(h)	
VIL2	cytoskeletal proteins; ERM family; ezrin.	ezrin(h)	ezrin(h)	
WASF2	adaptor proteins; WASP family proteins; WAVE/SCAR; WAVE-2 <splitfie		WAVE-2(h)	
0	Kinases			
ADRBK2	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase		betaARK-2(h)	
AKT2	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	AKT-2(h)	AKT-2(h)	
AKT3	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	AKT-3(h)	AKT-3(h)	
CDC23	Cdc23. (cell division cycle 23, yeast, homolog)		Cdc23(h)	
CDC25A	enzymes; hydrolases EC 3; hydrolases EC 3.1; phosphoric monoester h	Cdc25A(h)	Cdc25A(h)	
CDC25C	enzymes; hydrolases EC 3; hydrolases EC 3.1; phosphoric monoester h	Cdc25C(h)	Cdc25C(h)	
CDK4	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7	Cdk4(h)	Cdk4(h)	
CDKN1A	inhibitors; intracellular inhibitors; CKIs; Cip/Kip family; p21Cip1		p21Cip1(h)	
CDKN1B	inhibitors; intracellular inhibitors; CKIs; Cip/Kip family; p27Kip1		p27Kip1(h)	
CSNK2B	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase		CKII-beta(h)	
DUSP19	enzymes; hydrolases EC 3; hydrolases EC 3.1; phosphoric monoester h		DUSP19(h)	
DYRK1B	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase		Dyrk1B(h)	
GSK3A	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	GSK3alpha(h)	GSK3alpha(h)	
ILK	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7	ILK(h)	ILK(h)	
MAP2K2	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7	MEK2(h)	MEK2(h)	MEK2(h)
MAP3K10	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7	MLK2(h)	MLK2(h)	
MAP3K4	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	MEKK4(h)	MEKK4(h)	
MAP4K1	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7		HPK1(h)	
MAPK13	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	p38delta(h)	p38delta(h)	
MAPK14	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	p38alpha(h)	p38alpha(h)	
MAPKAPK3	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	MAPKAPK3(h)	MAPKAPK3(h)	
PLK1	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7	Plk1(h)	Plk1(h)	
PRKCB1	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	PKCbeta2(h)	PKCbeta2(h)	PKCbeta2(h)
PRKCD	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	PKCdelta(h)	PKCdelta(h)	PKCdelta(h)

Symbol	Functional Class	Calmodulin	Phosphatidylinositide / Lipids	PKC / PKA
PRKCI	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferase	PKCiota(h)	PKCiota(h)	PKCiota(h)
PTPN12	enzymes; hydrolases EC 3; hydrolases EC 3.1; phosphoric monoester hyd	PTP-PEST(h)	PTP-PEST(h)	PTP-PEST(h)
RPS6KA1	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7	RSK1(h)	RSK1(h)	
WEE1	enzymes; transferases EC 2; transferases EC 2.7; phosphotransferases EC 2.7		Wee1(h)	
0	Transcription / translation			
ATF2	transcription factors; ATF-2.	ATF-2(h)	ATF-2(h)	
DDIT3	transcription factors; CHOP-10.	CHOP-10(h)	CHOP-10(h)	
E2F2	transcription factors; E2F; E2F-2.		E2F-2(h)	
E2F3	transcription factors; E2F; E2F-3; E2F-3a.		E2F-3a(h)	
EGR1	transcription factors; Egr-1.		Egr-1(h)	
EVI1	transcription factors; Evi-1.		Evi-1(h)	
GTF2I	transcription factors; TFIID-I.	TFIID-I(h)	TFIID-I(h)	
HMGA1	transcription factors; HMGA1.		HMGI(Y)(h)	
MAZ	transcription factors; MAZ.	MAZi(h)	MAZi(h)	
NEUROD1	transcription factors; NeuroD; NeuroD1.		NeuroD1(h)	
NFATC4	transcription factors; NF-AT; NF-AT3.	NF-AT3(h)	NF-AT3(h)	
NFKB1	transcription factors; Rel; p50.	p50(h)	p50(h)	
NR3C1	transcription factors; nuclear receptors; GR; GR(h).	GR-alpha(h)		
SKIL	transcription factors; SnoN.		SnoN(h)	
STAT6	transcription factors; STATs; STAT6.		STAT6(h)	
SMAD5	Smads; R-Smads; Smad5 <splitfield> transcription factors; R-Smads;	Smad5(h)	Smad5(h)	
IGF1	ligands; cytokines; class VI cytokines; IGF; IGF-1; IGF-1B <splitfi		IGF-1B(h)	
IGF2	ligands; cytokines; class VI cytokines; IGF; IGF-2 <splitfield> lig		IGF-2(h)	
EIF4E	mRNA cap-binding proteins; eIF-4E.		eIF-4E(h)	
BCL3	inhibitors; intracellular inhibitors; IkappaB; Bcl-3.		Bcl-3(h)	
CISH	inhibitors; intracellular inhibitors; SOCS/CIS family; CIS.		CIS(h)	
0	Ca++ / calmodulin			
ATP2A1	transporters; ATPases; Ca2+ ATPases; SERCA; SERCA1.		SERCA1(h)	
ITPR3	membrane-transducing components; ion channels; calcium channels; IP	IP3R3(h)	IP3R3(h)	
CALM3	co-factors; CaM.	CaM(h)	CaM(h)	CaM(h)
0	varia			
IPO4	transporters; importin; importin-beta; importin-4.		importin-4(h)	
IPO7	transporters; importin; importin-beta; importin-7.		importin-7(h)	
NUDC	NudC. (nuclear distribution gene C homolog (A. nidulans))		NudC(h)	
NUP153	Nup153. (nucleoporin 153kDa)	Nup153(h)	Nup153(h)	
NCF1	co-factors; p47phox.	p47phox(h)	p47phox(h)	p47phox(h)
MAP4	cytoskeletal proteins; MAP; MAP-4.		MAP-4(h)	
STMN1	cytoskeletal proteins; stathmin family; stathmin.	stathmin(h)	stathmin(h)	
TDG	enzymes; hydrolases EC 3; glycosylases EC 3.2; TDG.		TDG(h)	
PLD1	enzymes; hydrolases EC 3; hydrolases EC 3.1; phosphoric diester hyd	PLD1b(h)	PLD1b(h)	
SYNJ2	enzymes; hydrolases EC 3; hydrolases EC 3.1; phosphoric mon	synaptjanin2(h)	synaptjanin2(h)	
GZMB	enzymes; hydrolases EC 3; peptidases EC 3.4; serine endopeptidases		granzymeB(h)	
PARK2	enzymes; ligases EC 6; ligases EC 6.3; acid-D-amino-acid ligases EC	parkin1(h)	parkin1(h)	
UBE2D2	enzymes; ligases EC 6; ligases EC 6.3; acid-D-amino-acid ligases EC	Ubc5C(h)	Ubc5C(h)	
APEX1	enzymes; lyases EC 4; carbon-oxygen lyases EC 4.2; Ref-1.		Ref-1(h)	
ADCY4	enzymes; lyases EC 4; phosphorus-oxygen lyases EC 4.6; AC; AC group 2	AC4(h)	AC4(h)	AC4(h)
ADCY7	enzymes; lyases EC 4; phosphorus-oxygen lyases EC 4.6; AC; AC group 2	AC7(h)	AC7(h)	AC7(h)
BIRC4	inhibitors; intracellular inhibitors; IAP-family; XIAP <splitfield> enzymes	XIAP(h)	XIAP(h)	
RBL2	inhibitors; intracellular inhibitors; Rb-family; p130 (main classification)	p130(h)		
CASP9	proCaspases; proCaspase-9.			proCaspase-9(h)

5 Diskussion

Die Pathophysiologie von CED ist durch eine Kombination aus einer gestörten Funktion der intestinalen Epithelbarriere und einer überschießenden Aktivierung des mukosalen Immunsystems gekennzeichnet [36]. Demnach sind für eine einwandfreie Funktion des intestinalen Systems die Vermeidung einer chronischen Entzündung und die rasche Behebung von Schäden der Mukosa unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Änderungen der mRNA Expression wichtiger Gene der intestinale Barriere untersucht.

5.1 Vergleichendes Expressionsmonitoring bei CED

Für die Expressionsanalyse der mukosalen Gewebe von CED Patienten kamen DNA-Microarrays zum Einsatz. Die hier verwendeten Affymetrix HGU133A und HGU133B Genchips der neuesten Generation umfassen rund 22.000 bekannte humane Gene und mehr als 33.000 ESTs. Sie sind ein geeignetes Mittel, um genomweite Transkriptionsprofile von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Biopsien erstellen, wobei die Beschränkungen von Einzelgen Analysen umgangen werden. Bisher benutzten drei Gruppen frühere Generationen von DNA-Microarrays zur Expressionsanalyse von intestinalem Gewebe bei CED, die allerdings nur eine wesentlich kleinere Anzahl an Genen und Transkripten abdeckten. Heller et al. verwendeten einen zur damaligen Zeit höchst innovativen cDNA Array mit 96 Genen [83]. Die Gruppe untersuchte Mukosaproben aus entzündeten Bereichen von Morbus Crohn Patienten und fanden hauptsächlich Veränderungen in der Expression von Genen des Immunsystems [83]. In zwei neueren Studien wurden hochdichte Oligonukleotid-Microarrays mit rund 7000 humanen Genen und ESTs eingesetzt, um die Transkriptionsprofile im intestinalen Gewebe bei Colitis ulcerosa [84], bzw. bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn [85] zu bestimmen.

Bei der angewandten Pooling Strategie von RNAs bei DNA-Microarray Experimenten handelt es um eine sehr effektive Methode biologische

Variationen in der Genexpression und außerdem die Kosten zu minimieren, ohne dabei einen Verlust an Präzision zu erleiden [86]. Weiterhin muss anfangs nicht die gesamte Menge an RNA in die DNA-Microarray Experimente eingesetzt werden, weshalb genug Material für Verifizierungsexperimente in Einzelproben übrig bleibt.

In zwei grundlegenden Punkten gab es Unterschiede zu den bisherigen Studien. Es wurden erstens Biopsien aus terminalen Ileum und Colon transversum untersucht, die zweitens aus nicht entzündeten Bereichen stammten. Dadurch konnten sekundäre Entzündungseffekte ausgeschlossen werden und die Auswirkungen von CED auf beide Gewebe spezifisch untersucht werden. Die Analyse der mRNA Profile von Markergenen mukosaler Zellpopulationen erlaubte eine quantitative Abschätzung der Zusammensetzung der Biopsien. Aus dem erhaltenen Transkriptionsmuster, mit einer starken Expression epithelzellspezifischer Gene (*fatty acid binding protein*, *villin* und *occludin*) sowie mit äußerst geringen mRNA Mengen von Markergenen potentiell kontaminierender Zellarten (CD45, CD14, CD16, CD80, CD86 und epimorphin), lässt sich ableiten, dass die Gewebeproben hauptsächlich die Genexpression von Epithelzellen repräsentieren. Somit stellen genomweite Expressionsanalysen, ausgehend von endoskopischen Biopsien mittels DNA-Microarrays ein geeignetes Werkzeug dar, um differentiell regulierte Gene in Epithelzellen bei CED zu identifizieren. In diesem Datensatz konnte unsere Arbeitsgruppe bereits eine Verlust der Detoxifikation durch Herabregulation von Phase I, Phase II und Phase III Genen identifizieren [45].

In den DNA-Microarray Ergebnissen waren im Ileum 295 (21% aller regulierten Gene) und im Colon 1253 (44%) Gene in beiden Krankheiten gemeinsam gleichartig reguliert, was mit der Beschränkung von Colitis ulcerosa auf das Colon erklärt werden kann und deshalb nur einen geringen Effekt im Ileum erwarten lässt. Im Gegensatz dazu sind bei Morbus Crohn das Colon und das Ileum gleichermaßen betroffen. Die größte Zahl an spezifisch bei Morbus Crohn dysregulierten Genen wurde im Ileum (934 Gene, 67%) identifiziert, wohingegen spezifisch bei Colitis ulcerosa hauptsächlich Gene im Colon (644 Gene, 23%) betroffen waren. Innerhalb aller bei CED differentiell regulierten

Gene, war die Gruppe der im Colon vermindert exprimierten Gene mit 1566 (55%) zahlenmäßig am größten.

Trotz der in den letzten Jahren signifikant verbesserten Qualität der DNA-Microarrays und der durch sie generierten Daten, existierenden immer noch technischen Limitationen. Um wahre biologische Signale vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden, sollte eine minimale durchschnittliche Fluoreszenzintensität definiert werden und nur Signale über diesem Schwellenwert in die anschließende Analyse eingehen. Notwendig ist dies, da DNA-Microarray Experimente auf Hybridisierungsergebnissen beruhen, wobei die Linearität der Signalintensität auf einen bestimmten Bereich beschränkt ist. Für Werte die darüber oder darunter liegen trifft dies jedoch nicht zu. Als Konsequenz daraus sollten in die Berechnung des *fold changes* (Bezug des Signalwertes auf die Kontrolle) bei der vergleichenden Expressionsanalyse nur solche Signale eingehen, die innerhalb des linearen Bereiches liegen und weiterhin sollte ein aussagekräftiger Schwellenwert – z.B. zweifach, wie hier geschehen – für die Hoch- oder Runterregulation definiert werden. Trotzdem ist es nötig innerhalb der als signifikant differentiell reguliert identifizierten Gene ein Subset für die Validierung mit einer unabhängigen Technik auszuwählen. Sehr gut geeignet dafür ist die real-time RT-PCR. Es handelt sich dabei um eine schnelle und präzise Methode zur Bestimmung von RNA Expressionsprofilen [87], wobei der 384-Well Maßstab eine gleichzeitige Analyse einer Vielzahl an Genen erlaubt. Besonders der *assay on demand* Service bei dem funktionsoptimierte Assays direkt bei Applied Biosystems bestellt werden können, beschleunigt und verbilligt den Prozess, da Design und Austestung entfallen. Somit ist die Identifizierung von differentiell regulierten Kandidatengenen mit hochdichten DNA-Microarrays und deren anschließende Verifizierung mit der real-time RT-PCR die effektivste Methode um verlässliche Genexpressionsprofile zu generieren.

Mittels der Pathway bezogenen Analyse konnte die in allen Fällen verminderte Expression sämtlicher intestinaler Mucine im Colon und im Ileum bei beiden Erkrankungen identifiziert werden. Die Eingruppierung der Gene nach verschiedenen Kriterien erwies sich in diesem Fall als sehr hilfreich, da alle

Mitglieder der Mucin Genfamilie eine Kategorie bildeten und deren koordinierte Regulation sofort auffiel. Zur Bestätigung der differentiellen Regulation von MUC1, MUC2, MUC4, MUC5B, MUC12, MUC13, MUC17 und MUC20 in einem größeren Kollektiv an unabhängigen Einzelproben und um deren Expression in verschiedenen Geweben zu bestimmen, wurde die TaqMan real-time RT-PCR verwendet.

Die Ergebnisse der gewebespezifischen Mucin Expression stimmen sowohl mit den DNA-Microarray als auch mit bereits publizierten Literatur Daten überein. Es gelang die intestinale Expression von MUC1, MUC2, MUC4 und MUC5B zu bestätigen, wobei MUC2 als das am höchsten exprimierte intestinale Mucin wiedergefunden wurde [88]. Weiterhin bestätigten sich die Expressionsmuster von MUC5AC, dessen mRNA nur im Magen- [89] sowie Atemwegsepithel [71], jedoch nicht im intestinalen Gewebe gefunden werden konnte. Die generelle Beschränkung der Mucin Expression auf epitheliale Gewebe spiegelt eine schützende Funktion wieder, die durch Ausbildung einer semipermeablen Barriere zwischen luminalen Bestandteilen und der Epithelzelloberfläche zustande kommt [57].

Die Expression von Mucin Genen bei CED wurde bisher für MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC und MUC5B untersucht, wohingegen über den Einfluss der restlichen Mitgliedern der Mucin Genfamilie keine Daten vorliegen. In diesen Studien wurden unterschiedliche und weniger sensitive Techniken, wie z.B. Blotting, *in situ* Hybridisierung oder Antikörperfärbung verwendet und jeweils nur eine kleine Zahl an Mucinen oder Geweben analysiert. Buisene et al identifizierten mittels quantitativer *dot-blot* Analyse eine verminderte MUC4 und MUC5B mRNA Menge im nicht betroffenen Ileum und eine reduzierte MUC1 Expression in betroffenen Gewebe bei Morbus Crohn Patienten [90]. Weiterhin wurde im Colon bei aktiver Colitis ulcerosa weniger MUC2 Protein gefunden, was mit einer möglicherweise gestörten Translation der vorhandenen mRNA erklärt wird, da die Expression auf mRNA Ebene bei gesunden Probanden und Patienten mit aktiver und auch inaktiver Colitis ulcerosa jedoch unverändert war [63]. Die gefundene Verminderung der Genexpression aller intestinaler Mucine

im nicht entzündeten Gewebe bei CED, legt einen primären Defekt der Mukosa nahe, welcher nicht sekundär durch die Entzündung ausgelöst wird.

Hier wurde zum ersten Mal ein umfangreicher und simultaner Überblick der Mucin Expression sowohl in gesunden Geweben, als auch im Ileum und Colon bei CED gegeben, was für die zukünftige funktionelle Analyse der Mukosa bei CED überaus hilfreich sein wird. Besondere Bedeutung könnte dies bei den erst kürzlich identifizierten und noch wenig charakterisierten Mucinen MUC12, MUC13, MUC17 und MUC20 erlangen. Es konnte eine sehr hohe MUC13 und MUC17 bzw. eine hohe MUC12 und MUC20 Expression im intestinalen Gewebe gezeigt werden, die eine wichtige Funktion dieser Proteine im Darmepithel vermuten lässt.

5.2 Transkriptionelle Regulationsmechanismen bei Mucin Genen

Eine Kombination aus Literaturdaten und umfangreicher *in silico* Promotoranalyse ergab, dass sämtliche intestinalen Mucine eine potentielle oder bereits experimentell gezeigte NF κ B Bindestelle aufweisen. Dies lässt eine wichtige Rolle dieser Signalkaskade bei der transkriptionellen Regulation von Mucinen vermuten. Zusätzliche Bestätigung lieferten die Promotoranalysen intestinaler Mucine, bei denen NFKB1 als überrepräsentierter Transkriptionsfaktor identifiziert wurde. Bei der Aktivierung der NF κ B Signalkaskade handelt es sich um einen allgemeinen Weg zur Zell-Aktivierung, was die Produktion von inflammatorischen Mediatoren, einschließlich einer Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen auslöst [91]. Daher wäre eine Signaltransduktion allein über die NF κ B Kaskade viel zu unspezifisch um die beobachtete gleichartige Regulation der Mucine bei CED zu erklären. Eine Beteilung weiterer Transkriptionsfaktoren ist sehr wahrscheinlich, da im allgemeinen funktionell verwandte Gene, die an den selben molekulargenetischen, biochemischen oder physiologischen Prozessen beteiligt sind, häufig durch eine spezifische Kombination von Transkriptionsfaktoren gleichartig reguliert werden. Um solche Transkriptionsfaktormodule und die zugrunde liegenden regulatorischen Netzwerke

aufzuklären, ist das Composite Module FinderTM Programm sehr hilfreich. Es wurde bereits erfolgreich eingesetzt um die regulatorischen Sequenzen von bekannten Zielgenen des Transkriptionsfaktors *arylhydrocarbon receptor* (AHR) zu untersuchen. Mit einem berechneten *composite* Modul wurden dann neue Zielgene vorausgesagt, die sich im DNA-Microarray Experiment nach AHR Aktivierung als differentiell reguliert zeigten und somit bestätigt werden konnten [92]. Das hier berechnete *composite* Modul konnte Mucin Promotoren von Promotoren bei CED nicht regulierter Gene klar unterscheiden und wurde ebenfalls in den regulatorischen Sequenzen einer Vielzahl von Schlüsselgenen der intestinalen Mukosa identifiziert. Darunter waren Defensine, *trefoil factor Proteine* und sekretorische dimere Immunglobuline. Defensine sind kleine antibiotisch wirksame Proteine, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie sorgen für eine adäquate Elimination Darm schädigender Mikroorganismen, indem sie durch einen noch nicht im Detail verstandenen Mechanismus deren Zellwand zerstören [93]. Folglich bleibt ein Kontakt von eingedrungenen Bakterien mit der Mukosa aus und eine Entzündungsreaktion wird verhindert. Bei *trefoil factor* Proteinen handelt es sich um kleine, Cystein reiche Peptide, die zwei wichtige Funktionen erfüllen. Sie schützen zum einen die Mukosa durch Ausbildung von Interaktionen oder Querverbindungen mit den Mucin Proteinen, was eine verstärkte Schleimschicht zur Folge hat. Weiterhin tragen sie zur Heilung einer verletzten Mukosa bei, indem ihre Expression schnell hochreguliert wird und sie einen „epitheliale Restitution“ genannten Prozess stimulieren [57]. Sekretorisches dimeres Immunglobulin A (IgA) ist die Haupt-Antikörperklasse in den Schleimhäuten (siehe auch Einleitung). Sie gilt als Teil des primitiven, T-Zell unabhängigen, Immunsystems und bildet die erste Verteidigungsline gegen Pathogene im Darmlumen. Zusammen mit dem polymeren Ig Rezeptor (plgR) wird IgA als Ligand-Rezeptor Komplex basolateral exprimiert und von sekretorischen Epithelzellen in Vesikeln auf die apikale Seite transportiert. Viren und Bakterien werden schließlich sowohl während des Transportes intrazellulär als auch danach extrazellulär durch eine umfangreiche Anheftung von IgA Molekülen an ihre Oberfläche effektiv neutralisiert [94][95]. Eine eingeschränkte Funktion all dieser Systeme aufgrund

einer verminderten Genexpression, ausgelöst durch ein gemeinsames transkriptionelles Motiv, würde die auftretenden Effekte bei CED gut erklären. Im Moment wird ausführlich analysiert ob die Gene in denen das *composit* Modul identifiziert wurde, intestinal exprimiert werden und bei CED differentiell reguliert sind. Trifft dies zu, wäre diese Strategie geeignet weitere CED Kandidatengene innerhalb dieses transkriptionellen Netzwerkes zu enthüllen und einen tieferen Einblick in diese komplexen regulatorischen Mechanismen zu erhalten.

Die Zellkulturergebnisse zeigen eine Sensitivität sämtlicher intestinaler Mucine gegenüber TNF α und TGF β , zwei Zytokine die bekannte Aktivatoren der NF κ B Signalkaskade darstellen. Bisher wurde nur für MUC2 in LS174T und HT29 Zellen [96], sowie für MUC5AC in kultivierten humanen Nasenpolyp Epithelzellen [97] eine Induktion der Expression nach TNF α Stimulation beschrieben. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression aller intestinalen Mucine durch TNF α induziert wird. Dies ist von besonderem Interesse, da eine fehlerhafte TNF α Produktion und eine anhaltende Aktivierung des TNF α Signalweges bereits mit der Pathogenese zahlreicher chronischer Entzündungserkrankungen – einschließlich CED – in Verbindung gebracht wurde [98].

Weiterhin konnten Hahm und Kollegen zeigen, dass ein Verlust des TGF β Signals im intestinalen Epithelzellgewebe die Suszeptibilität für Colitis ulcerosa in transgenen Mäusen erhöht. Dies geschieht durch die Kombination einer gesteigerten Expression von *major histocompatibility complex (MHC) class II* Proteinen, einer erhöhten Aktivität von intestinalen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und einer verstärkten Produktion von Autoantikörpern, was im Zusammenspiel zu einer verstärkten Zerstörung der Mukosa führt [99].

Die Verhinderung der durch die beiden Zytokine TGF β und TNF α induzierten Mucin Genexpression durch die NF κ B Inhibitoren CAPE und MG132 liefert den Beweis, dass die Mucin Induktion über die NF κ B Signalkaskade vermittelt wird. Weiterhin legt sie eine direkte funktionelle Verbindung der TGF β und der NF κ B

Signaltransduktion bei der transkriptionellen Regulation aller intestinalen Mucine nahe, welche bisher nur für MUC2 gezeigt werden konnte [78].

Die Induktion der Mucin Expression bei alleiniger CAPE Inkubation nach 24h kann mit dem breiten Wirkungsspektrum dieser Substanz erklärt werden. In der Maus konnte *in vitro* eine durch CAPE verstärkte Magensäure Sekretion gezeigt werden [100]. Eine erhöhte Menge an aggressiver Magensäure würde auch eine verstärkten Schutz des Magenepithels nötig machen und könnte somit zeitverzögert eine verstärkte Mucin Genexpression auslösen.

5.3 Allelische Diskriminierung von Mucin Polymorphismen

Für die Pathogenese von CED ist, wie in der Einleitung bereits näher beschrieben, auch eine genetische Komponente mitverantwortlich, die sich durch Vererbung von Genmutationen oder Polymorphismen ausdrückt. Zur Aufklärung dieser genetischen Prädisposition werden im allgemeinen zwei, sich gegenseitig ergänzende, Verfahren angewandt. Dabei handelt es sich um genetische *linkage* Analysen (Kopplungsanalysen) und Kandidatengen Assoziationsstudien.

Bei *linkage* Analysen wird in einem genomweiten Ansatz versucht, chromosomale Abschnitte gekoppelt, mit bestimmten krankheitsrelevanten Merkmalen (Polymorphismen oder Mutationen) zu identifizieren, die in betroffenen Familien statistisch gehäuft gemeinsam vererbt werden. Definiert werden diese Regionen mittels genetischer Marker, deren genaue Sequenz sowie Lage bekannt sind und die sich über das gesamte Genom verteilen. Liegen Marker und krankheitsrelevantes Merkmal nahe genug zusammen, besteht nur eine niedrige Wahrscheinlichkeit durch homologe Rekombination während der Meiose getrennt zu werden und deshalb werden beide gemeinsam vererbt [35]. Seit der ersten CED *linkage* Analyse 1996 [101] liefen eine Vielzahl weiterer Screens und Bestätigungsstudien. Eine 2004 publizierte Metaanalyse fasst alle 11 bisher durchgeführten genomweiten CED *linkage* Studien zusammen [80]. Insgesamt konnten 38 mit CED assoziierte chromosomale Regionen gefunden werden, die jedoch nicht alle gleich hohe Evidenzen

zeigten. Die hohe Zahl an *linkage* Regionen, im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen mit nur einem Suszeptibilitäts Locus, ist nicht verwunderlich, da CED komplexe genetische Funktionsstörungen darstellen, deren Krankheitsausprägungen durch zahlreiche Gene beeinflusst werden, was auch als genetische Heterogenität bezeichnet wird. Infolge dieser Heterogenität ist eine konsistente Verifizierungswiederholung oft nicht möglich, weshalb versucht wird, sie zu reduzieren. Dazu werden nachträglich die bestehenden Datensätze nach ethnischen und/oder geographischen Aspekten gruppiert und diese homogenen Untergruppen dann erneut charakterisiert [35][80].

Je mehr Marker in eine *linkage* Analyse eingehen, desto besser ist die Auflösung, d.h. desto näher können die Abschnitte auf den Chromosomen eingegrenzt werden. Trotzdem ist es mit dieser Methode nicht möglich einzelne Krankheitsgene zu identifizieren, da in den Regionen eine Vielzahl an Genen lokalisiert sind. Deshalb wird mit weiteren Methoden wie genetischen Assoziationsstudien oder der *mapping and arraying* Strategie versucht, die zu Grunde liegenden spezifischen Kandidatengene zu finden.

Bei genetischen Assoziationsstudien ermöglicht ein Vergleich einer Patientenstichprobe mit einer Kontrollgruppe gesunder Personen, ein mit der Erkrankung gekoppeltes genetisches Merkmal, also eine Veränderung in der DNA-Sequenz, zu finden. Im Idealfall lassen sich aus den detektierten unterschiedlichen Allelfrequenzen einzelne Kandidatengene identifizieren. Meistens erhält man aber ebenfalls nur assoziierte Regionen auf dem Chromosom, die im Vergleich zu den *linkage* Analyse Ergebnissen allerdings kürzer sind und deshalb weniger potentielle Kandidatengene enthalten.

Mit der Ausnahme von NOD2/CARD15 im chromosomalen Locus 16q21, konnten mit diesen Methoden bisher keine weiteren CED Kandidatengene in den restlichen Loci identifiziert werden. Darum werden entweder deutliche Steigerungen in der Auflösung, durch Analyse einer größeren Zahl an Markern oder neue Methoden benötigt. Eine vielversprechende, erst durch die Verbesserungen in der Qualität der Expressionsanalyse mit DNA-Microarrays möglich gewordene neue Methode zur Kandidatengenfindung ist die *mapping*

and arraying Strategie. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Assoziationsstudien mit Expressionsanalysen [102]. Alle Gene innerhalb einer krankheitsassoziierten Genomregion werden identifiziert und auf differentielle Regulation bei der Erkrankung geprüft, um so die Zahl an putativen Kandidatengenen einzuschränken. Diese Methode funktioniert allerdings nur, falls durch eine genetische Variation (Mutation oder SNP) die Expression eines Gens verändert wird.

Hier konnte mittels *mapping and arraying* gezeigt werden, dass alle intestinal exprimierten Mucine in mit CED assoziierten Regionen liegen und vermindert exprimiert werden. Um zu prüfen, ob es sich bei den Mucinen tatsächlich um Kandidatengene für CED handelt, wurden bereits bekannte Mucin SNPs mittels TaqMan allelischer Diskriminierung genotypisiert. Um die Wahrscheinlichkeit einer funktionellen Auswirkung zu erhöhen, wurden die Polymorphismen nach folgenden Kriterien ausgewählt: Sie sind im codierenden Bereich lokalisiert und verursachen bevorzugt einen Aminosäureaustausch. Das 384-Well Format und die ausgereifte Technologie ermöglichen eine schnelle und gut funktionierende Genotypisierung, was sich in der Kollektivgröße (MC n=181, CU n=220, Kontrolle n=250) und einer Bestimmungsrate von durchschnittlich fast 95% wiederspiegelt. Weiterhin sprachen für die Qualität der Messung die P-Werte der beiden als Positivkontrollen genotypisierten NOD2 SNPs (NOD2-G908R und NOD2-R702W), die hoch signifikant mit Morbus Crohn jedoch nicht mit Colitis ulcerosa assoziiert waren, was mit den Literaturdaten gut übereinstimmt [81][82]. Die gefundenen signifikanten Assoziationen von MUC2 mit Morbus Crohn und von MUC4 sowie MUC13 mit Colitis ulcerosa lassen eine kausale Rolle der Mucine in der Entstehung von CED vermuten. Sie stellen interessante Startpunkte für detailliertere Analysen dar, bei denen insbesondere die übrigen Mucine auf ihre Beteiligung an CED überprüft werden sollen. Dabei sollen diese drei SNPs in größeren CED Patientenkollektiven gemessen werden, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen. Zusätzlich ist geplant, alle differentiell regulierten intestinalen Mucine zu sequenzieren und das Ergebnis mit den Informationen in SNP-Datenbanken wie NCBI Entrez SNP, The SNP Consortium LTD bzw. HapMap abzugleichen. Somit identifizierte neue SNPs

bzw. Mutationen sollen dann ebenfalls im größeren Kollektiv genotypisiert und auf Assoziation mit CED überprüft werden. Als erster Schritt wurde bereits mit der Sequenzierung von MUC13 begonnen.

Weiterhin lieferte die Untersuchung der CED Kandidatenloci mit der *mapping and arraying* Strategie interessante Ansatzpunkte für weiterführende Analysen. Mit Hilfe der Metaanalyse von Brant und Kollegen, die sämtliche bisher identifizierten CED Kandidatenloci in einer Übersichtsarbeit zusammenfasst [80], war es möglich alle Gene in den beschriebenen Loci zu ermitteln und auf unsere CED DNA-Microarray Ergebnisse abzubilden. Da es sich um Gene aus CED Kandidatenloci handelte, war die hohe Zahl (476 von 3367) an bei CED differentiell regulierten Genen nicht überraschend. Die Pathway bezogene Analyse ergab, dass sich diese Gene auf die selben Kategorien verteilen wie alle bei CED differentiell regulierten Gene, unabhängig von ihrer chromosomalen Lokalisation. Es handelt sich dabei um die grundlegenden Mechanismen die zur Entstehung und Entwicklung von CED beitragen. Durch eine gestörte intestinale Barrierefunktion (extrazelluläre Matrix Gene, Zell-Zell Kontakt Gene) kommt es durch den Kontakt von luminalen Agentien mit der Epithelzelloberfläche zu einer chronischen Entzündung (Zytokine, Chemokine, Entzündung), die zusätzlich durch den Verlust der zellulären Entgiftung (Detoxifikation) begünstigt wird. Die daraus resultierenden massiven strukturellen Schäden des zellulären Verbunds (Apoptose, Energiestoffwechsel) versucht der Organismus schließlich zu kompensieren (Lipid Metabolismus, vesikulärer Transport, transkriptionelle Regulation).

Eine wichtige Rolle scheint auch die Calcium Signalkaskade zu spielen, die sowohl in beiden Pathway bezogenen Auswertungen als auch bei der TRANSPATH™ Analyse gefunden wurde. In den CED Kandidatenloci Genen waren besonders die PKA-, PKC-, TP53- und die CAM- Signalkaskaden repräsentiert. Es handelt sich dabei um Calcium abhängige Signalwege, die ineinander greifen und zahlreiche zelluläre Prozesse steuern [103]. Die Proteinkinasen von Typ A und Typ C sind Calcium abhängige Kinasen, die eine Vielzahl an Zielgenen phosphorylieren. TP53 spielt als nukleäres DNA-Bindeprotein eine entscheidende Rolle in der Steuerung des Zellzyklus, speziell

im Übergang von der G0 zur G1 Phase. Bei der CAM Familie handelt es sich um Calcium abhängige Serin/Threonin Proteinkinasen im Calcium Signalweg. In der Phosphatidylinositol Signalkaskade werden extrazelluläre Signale von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Rezeptor Tyrosin Kinases über eine Aktivierung der Phospholipase C über die Zellmembran ins Innere der Zelle geleitet. In Zusammenarbeit mit der BIOBASE GmbH laufen im Moment weitere Analysen, die zum einen transkriptionelle Netzwerke in den CED Kandidatenloci identifizieren und andererseits die Rolle der Calcium Signalkaskade im Detail untersuchen sollen.

6 Zusammenfassung

Die intestinale Barriere spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Durch Ausbildung von undurchlässigen Zell-Zell-Verbindungen sowie durch Freisetzung von protektiven Komponenten wie Phospholipiden, Mucinen, *trefoil factor* Proteinen, Defensinen und sekretorischen dimeren Immunglobulinen vermittelt die intestinale Epithelzellschicht einen selektiven Schutz vor schädlichen luminalen Bestandteilen. Ziel dieser Arbeit war es, Änderungen in der Transkription von Genen zu charakterisieren, die am Aufbau und der Funktion der intestinalen Barriere beteiligt sind.

DNA-Microarray Analysen zeigten eine koordiniert verminderte Expression der intestinalen Mucine MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC12, MUC13, MUC17 und MUC20 in nicht entzündeten Bereichen des Ileums und des Colons von Colitis ulcerosa sowie Morbus Crohn Patienten. Diese differentielle Mucin Regulation konnte in einer größeren Zahl an unabhängigen Einzelbiopsien mittels TaqMan real-time RT-PCR bestätigt werden. Ein gewebespezifisches mRNA Expressionsprofil dieser Mucine ergab eine auf epitheliale Gewebe beschränkte Expression. Durch eine *in silico* Analyse der regulatorischen Bereiche konnte in allen intestinalen Mucin Promotoren eine NF κ B Bindestelle identifiziert werden. Zusätzlich war dieser Transkriptionsfaktor in Mucin Promotoren überrepräsentiert und Bestandteil einer spezifischen Kombination von Transkriptionsfaktoren (*composite* Modul), welche Mucin Promotoren im Vergleich zu Promotoren von bei CED nicht regulierten Genen deutlich unterscheiden kann. Im intestinalen LS174T Zellkulturmodell führten Stimulationen mit den Zytokinen Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und Transformierender Wachstumsfaktor β (TGF β) zu einer Induktion der Mucin Expression, die durch die beiden NF κ B Hemmer *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE) und *Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal* (MG132) verhindert werden konnte. Bei der allelischen Diskriminierung von Mucin Polymorphismen

ergab sich für MUC2-V116M ($P=0,003$) eine statistisch signifikante Assoziation mit Morbus Crohn, während MUC4-A585S ($P=0,025$) und MUC13-R502S ($P=0,0003$) mit Colitis ulcerosa assoziiert waren, was eine kausale Rolle der Mucine in der Prädisposition von CED vermuten lässt.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse eine stark verminderte Genexpression aller intestinalen Mucine bei CED, die durch ein gemeinsames transkriptionelles Regulatormotiv erklärt werden kann. Somit ist eine Beteiligung der Mucine an der Pathophysiologie von CED sehr wahrscheinlich, da diese Proteine aufgrund ihrer Schutzfunktion maßgeblich zur Integrität der intestinalen Barriere beitragen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Benninghoff A, Drenckhahn D. Anatomie - Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 16 ed. Urban & Fischer, 2003.
- 2 de Santa BP, Van den Brink GR, Roberts DJ. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2003;60(7):1322-32.
- 3 Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:695-723.
- 4 Okamoto R, Watanabe M. Cellular and molecular mechanisms of the epithelial repair in IBD. *Dig Dis Sci* 2005;50 Suppl 1:S34-S38.
- 5 Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 2000;103(2):311-20.
- 6 Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003;1653(1):1-24.
- 7 Watt FM. Unexpected Hedgehog-Wnt interactions in epithelial differentiation. *Trends Mol Med* 2004;10(12):577-80.
- 8 Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296(5573):1644-6.
- 9 Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87(2):159-70.
- 10 Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275(5307):1784-7.
- 11 Pinto D, Clevers H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. *Exp Cell Res* 2005;306(2):357-63.
- 12 van de WM, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der HK, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den BM, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111(2):241-50.

- 13 Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 2000; **342**(18):1350-8.
- 14 Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; **113**(6):685-700.
- 15 Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, . Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; **268**(5215):1336-8.
- 16 Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrusilis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 1996; **86**(4):543-52.
- 17 Howe JR, Bair JL, Sayed MG, Anderson ME, Mitros FA, Petersen GM, Velculescu VE, Traverso G, Vogelstein B. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. *Nat Genet* 2001; **28**(2):184-7.
- 18 Zhou XP, Woodford-Richens K, Lehtonen R, Kurose K, Aldred M, Hampel H, Launonen V, Virta S, Pilarski R, Salovaara R, Bodmer WF, Conrad BA, Dunlop M, Hodgson SV, Iwama T, Jarvinen H, Kellokumpu I, Kim JC, Leggett B, Markie D, Mecklin JP, Neale K, Phillips R, Piris J, Rozen P, Houlston RS, Aaltonen LA, Tomlinson IP, Eng C. Germline mutations in BMPR1A/ALK3 cause a subset of cases of juvenile polyposis syndrome and of Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndromes. *Am J Hum Genet* 2001; **69**(4):704-11.
- 19 Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999; **284**(5415):770-6.
- 20 Baron M. An overview of the Notch signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 2003; **14**(2):113-9.
- 21 Mumm JS, Kopan R. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 2000; **228**(2):151-65.
- 22 Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ, Zoghbi HY. Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 2001; **294**(5549):2155-8.

- 23 Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 2000;127(12):2763-72.
- 24 Van den Brink GR, Bleuming SA, Hardwick JC, Schepman BL, Offerhaus GJ, Keller JJ, Nielsen C, Gaffield W, van Deventer SJ, Roberts DJ, Peppelenbosch MP. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat Genet* 2004;36(3):277-82.
- 25 Mo R, Kim JH, Zhang J, Chiang C, Hui CC, Kim PC. Anorectal malformations caused by defects in sonic hedgehog signaling. *Am J Pathol* 2001;159(2):765-74.
- 26 Beck F. The role of Cdx genes in the mammalian gut. *Gut* 2004;53(10):1394-6.
- 27 Walters JR. Recent findings in the cell and molecular biology of the small intestine. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21(2):135-40.
- 28 Mutoh H, Hakamata Y, Sato K, Eda A, Yanaka I, Honda S, Osawa H, Kaneko Y, Sugano K. Conversion of gastric mucosa to intestinal metaplasia in Cdx2-expressing transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294(2):470-9.
- 29 Silberg DG, Sullivan J, Kang E, Swain GP, Moffett J, Sund NJ, Sackett SD, Kaestner KH. Cdx2 ectopic expression induces gastric intestinal metaplasia in transgenic mice. *Gastroenterology* 2002;122(3):689-96.
- 30 Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Kedinger M, Beck F, Freund JN, Domon-Dell C. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 2003;52(10):1465-71.
- 31 Divine JK, Staloch LJ, Haveri H, Jacobsen CM, Wilson DB, Heikinheimo M, Simon TC. GATA-4, GATA-5, and GATA-6 activate the rat liver fatty acid binding protein gene in concert with HNF-1alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287(5):G1086-G1099.
- 32 Burch JB. Regulation of GATA gene expression during vertebrate development. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(1):71-81.
- 33 Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER, Traber PG. Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 2002;277(35):31909-17.

- 34 van Wering HM, Huibregtse IL, van der Zwan SM, de Bie MS, Dowling LN, Boudreau F, Rings EH, Grand RJ, Krasinski SD. Physical interaction between GATA-5 and hepatocyte nuclear factor-1alpha results in synergistic activation of the human lactase-phlorizin hydrolase promoter. *J Biol Chem* 2002;277(31):27659-67.
- 35 Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124(2):521-36.
- 36 Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347(6):417-29.
- 37 Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324(2):84-8.
- 38 Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996;111(3):597-603.
- 39 Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1988;29(7):990-6.
- 40 Oliva-Hemker M, Fiocchi C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel disease: the importance of the pediatric perspective. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8(2):112-28.
- 41 Andres PG, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28(2):255-81, vii.
- 42 Andus T, Gross V. Etiology and pathophysiology of inflammatory bowel disease--environmental factors. *Hepatogastroenterology* 2000;47(31):29-43.
- 43 Scholmerich J. New developments in aetiological mechanisms of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15(6):585-6.
- 44 Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115(1):182-205.
- 45 Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G. Loss of detoxification in inflammatory bowel

- disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* 2004;127(1):26-40.
- 46 Jankowski JA, Bedford FK, Boulton RA, Cruickshank N, Hall C, Elder J, Allan R, Forbes A, Kim YS, Wright NA, Sanders DS. Alterations in classical cadherins associated with progression in ulcerative and Crohn's colitis. *Lab Invest* 1998;78(9):1155-67.
- 47 Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;116(2):301-9.
- 48 Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6):1131S-41S.
- 49 Ehehalt R, Wagenblast J, Erben G, Lehmann WD, Hinz U, Merle U, Stremmel W. Phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in intestinal mucus of ulcerative colitis patients. A quantitative approach by nanoElectrospray-tandem mass spectrometry. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(8):737-42.
- 50 Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci* 2002;27(3):126-31.
- 51 Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DT, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 1989;264(11):6480-7.
- 52 Gum JR, Hicks JW, Swallow DM, Lagace RL, Byrd JC, Lamport DT, Siddiki B, Kim YS. Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171(1):407-15.
- 53 Lan MS, Batra SK, Qi WN, Metzgar RS, Hollingsworth MA. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* 1990;265(25):15294-9.
- 54 Porchet N, Dufosse J, Audie JP, Duperat VG, Perini JM, Nguyen VC, Degand P, Aubert JP. Structural features of the core proteins of human airway mucins ascertained by cDNA cloning. *Am Rev Respir Dis* 1991;144(3 Pt 2):S15-S18.

- 55 Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci* 2001;6:D1192-D1206.
- 56 Van Klinken BJ, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. Strategic biochemical analysis of mucins. *Anal Biochem* 1998;265(1):103-16.
- 57 Shirazi T, Longman RJ, Corfield AP, Probert CS. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* 2000;76(898):473-8.
- 58 Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS, Pratt WS, Galiege-Zouitina S, d'Hooge MC, Laine A, Van Seuningen I, Degand P, Gum JR, Kim YS, Swallow DM, Aubert JP, Porchet N. Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 1996;38(3):340-52.
- 59 Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14(2):199-202.
- 60 Stremmel W, Merle U, Zahn A, Autschbach F, Hinz U, Ehehalt R. Retarded release phosphatidylcholine benefits patients with chronic active ulcerative colitis. *Gut* 2005;54(7):966-71.
- 61 Kyo K, Parkes M, Takei Y, Nishimori H, Vyas P, Satsangi J, Simmons J, Nagawa H, Baba S, Jewell D, Muto T, Lathrop GM, Nakamura Y. Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3. *Hum Mol Genet* 1999;8(2):307-11.
- 62 Pullan RD, Thomas GA, Rhodes M, Newcombe RG, Williams GT, Allen A, Rhodes J. Thickness of adherent mucus gel on colonic mucosa in humans and its relevance to colitis. *Gut* 1994;35(3):353-9.
- 63 Tytgat KM, van der Wal JW, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. Quantitative analysis of MUC2 synthesis in ulcerative colitis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224(2):397-405.
- 64 Parker N, Tsai HH, Ryder SD, Raouf AH, Rhodes JM. Increased rate of sialylation of colonic mucin by cultured ulcerative colitis mucosal explants. *Digestion* 1995;56(1):52-6.
- 65 Raouf AH, Tsai HH, Parker N, Hoffman J, Walker RJ, Rhodes JM. Sulphation of colonic and rectal mucin in inflammatory bowel disease: reduced sulphation of rectal mucus in ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)* 1992;83(5):623-6.

- 66 Förster VT. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics (Leipzig)* 1948;2:55-75.
- 67 Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 1997;25(13):2657-60.
- 68 Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 2002;30(1):207-10.
- 69 Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001;29(4):365-71.
- 70 Chen Y, Zhao YH, Kalaslavadi TB, Hamati E, Nehrke K, Le AD, Ann DK, Wu R. Genome-wide search and identification of a novel gel-forming mucin MUC19/Muc19 in glandular tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30(2):155-65.
- 71 Hovenberg HW, Davies JR, Herrmann A, Linden CJ, Carlstedt I. MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions. *Glycoconj J* 1996;13(5):839-47.
- 72 Langmann T, Mauerer R, Zahn A, Moehle C, Probst M, Stremmel W, Schmitz G. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin Chem* 2003;49(2):230-8.
- 73 Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van S, I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2001;276(33):30923-33.
- 74 Van S, I, Perrais M, Pigny P, Porchet N, Aubert JP. Sequence of the 5'-flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC5B in different phenotypes of colon cancer cells. *Biochem J* 2000;348 Pt 3:675-86.
- 75 Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Nouvet FJ, Brant SR.

- Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004;13(1):35-45.
- 76 Natarajan K, Singh S, Burke TR, Jr., Grunberger D, Aggarwal BB. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(17):9090-5.
- 77 Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000;289(5484):1560-3.
- 78 Jono H, Shuto T, Xu H, Kai H, Lim DJ, Gum JR, Jr., Kim YS, Yamaoka S, Feng XH, Li JD. Transforming growth factor-beta -Smad signaling pathway cooperates with NF-kappa B to mediate nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC2 mucin transcription. *J Biol Chem* 2002;277(47):45547-57.
- 79 Kyo K, Muto T, Nagawa H, Lathrop GM, Nakamura Y. Associations of distinct variants of the intestinal mucin gene MUC3A with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Hum Genet* 2001;46(1):5-20.
- 80 Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(3):300-11.
- 81 Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard 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* 2001;411(6837):599-603.
- 82 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, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411(6837):603-6.
- 83 Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(6):2150-5.

- 84 Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, Swanson PE, Harrington CA. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics* 2000;4(1):1-11.
- 85 Lawrence IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* 2001;10(5):445-56.
- 86 Kendzierski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics* 2003;4(3):465-77.
- 87 Mills JC, Roth KA, Cagan RL, Gordon JI. DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell. *Nat Cell Biol* 2001;3(8):E175-E178.
- 88 Tytgat KM, Opdam FJ, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. MUC2 is the prominent colonic mucin expressed in ulcerative colitis. *Gut* 1996;38(4):554-63.
- 89 Van den Brink GR, Tytgat KM, Van der Hulst RW, Van der Loos CM, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. H pylori colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* 2000;46(5):601-7.
- 90 Buisine MP, Desreumaux P, Debailleul V, Gambiez L, Geboes K, Ectors N, Delescaut MP, Degand P, Aubert JP, Colombel JF, Porchet N. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5(1):24-32.
- 91 Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 2004;18(18):2195-224.
- 92 Kel A, Reymann S, Matys V, Nettesheim P, Wingender E, Borlak J. A novel computational approach for the prediction of networked transcription factors of aryl hydrocarbon-receptor-regulated genes. *Mol Pharmacol* 2004;66(6):1557-72.
- 93 Yang D, Biragyn A, Kwak LW, Oppenheim JJ. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol* 2002;23(6):291-6.
- 94 Johansen FE, Brandtzaeg P. Transcriptional regulation of the mucosal IgA system. *Trends Immunol* 2004;25(3):150-7.
- 95 Phalipon A, Corthesy B. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol* 2003;24(2):55-8.

-
- 96 Iwashita J, Sato Y, Sugaya H, Takahashi N, Sasaki H, Abe T. mRNA of MUC2 is stimulated by IL-4, IL-13 or TNF-alpha through a mitogen-activated protein kinase pathway in human colon cancer cells. *Immunol Cell Biol* 2003;81(4):275-82.
- 97 Young KJ, Kim CH, Kim KS, Choi YS, Lee JG, Yoon JH. Extracellular signal-regulated kinase is involved in tumor necrosis factor-alpha-induced MUC5AC gene expression in cultured human nasal polyp epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 2004;124(8):953-7.
- 98 Papadakis KA, Targan SR. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* 2000;119(4):1148-57.
- 99 Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signalling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49(2):190-8.
- 100 Borrelli F, Posadas I, Capasso R, Aviello G, Ascione V, Capasso F. Effect of caffeic acid phenethyl ester on gastric acid secretion in vitro. *Eur J Pharmacol* 2005;521(1-3):139-43.
- 101 Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379(6568):821-3.
- 102 Wayne ML, McIntyre LM. Combining mapping and arraying: An approach to candidate gene identification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):14903-6.
- 103 Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(7):517-29.

8 Eigene Publikationen

Moehle,C., Ackermann,N., Langmann,T., Aslanidis,C., Kel,A., Kel-Margoulis,O., Scmitz-Madry,A., Zahn,A., Stremmel,W., & Schmitz,G. Aberrant intestinal expression and allelic variants in mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *Gut* submitted

Sacha,T., Zawada,M., Hartwich,J., Lach,Z., Polus,A., Szostek,M., Zdzi,O.E., Libura,M., Bodzioch,M., Dembinska-Kiec,A., Skotnicki,A.B., Goralczyk,R., Wertz,K., Riss,G., **Moehle,C.**, Langmann,T., & Schmitz,G. The effect of beta-carotene and its derivatives on cytotoxicity, differentiation, proliferative potential and apoptosis on the three human acute leukemia cell lines: U-937, HL-60 and TF-1. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 206-214 (2005).

Bodzioch,M., Dembinska-Kiec,A., Hartwich,J., Lapicka-Bodzioch,K., Banas,A., Polus,A., Grzybowska,J., Wybranska,I., Dulinska,J., Gil,D., Laidler,P., Placha,W., Zawada,M., Balana-Nowak,A., Sacha,T., Kiec-Wilk,B., Skotnicki,A., **Moehle,C.**, Langmann,T., & Schmitz,G. The microarray expression analysis identifies BAX as a mediator of beta-carotene effects on apoptosis. *Nutr. Cancer* **51**, 226-235 (2005).

Langmann,T., Liebisch,G., **Moehle,C.**, Schifferer,R., Dayoub,R., Heiduczek,S., Grandl,M., Dada,A., & Schmitz,G. Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochim. Biophys. Acta* **1740**, 155-161 (2005).

Langmann,T., **Moehle,C.**, Mauerer,R., Scharl,M., Liebisch,G., Zahn,A., Stremmel,W., & Schmitz,G. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology* **127**, 26-40 (2004).

Botella,J.A., Ulschmid,J.K., Gruenewald,C., **Moehle,C.**, Kretzschmar,D., Becker,K., & Schneuwly,S. The Drosophila carbonyl reductase sniffer prevents oxidative stress-induced neurodegeneration. *Curr. Biol.* **14**, 782-786 (2004).

Langmann,T., Schumacher,C., Morham,S.G., Honer,C., Heimerl,S., **Moehle,C.**, & Schmitz,G. ZNF202 is inversely regulated with its target genes ABCA1 and apoE during macrophage differentiation and foam cell formation. *J. Lipid Res.* **44**, 968-977 (2003).

Langmann,T., Mauerer,R., Zahn,A., **Moehle,C.**, Probst,M., Stremmel,W., & Schmitz,G. Real-time reverse transcription-PCR expression profiling of the complete human ATP-binding cassette transporter superfamily in various tissues. *Clin. Chem.* **49**, 230-238 (2003).

Kielar,D., Kaminski,W.E., Liebisch,G., Piehler,A., Wenzel,J.J., **Moehle,C.**, Heimerl,S., Langmann,T., Friedrich,S.O., Bottcher,A., Barlage,S., Drobnik,W., & Schmitz,G. Adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporters are expressed and regulated during terminal keratinocyte differentiation: a potential role for ABCA7 in epidermal lipid reorganization. *J. Invest Dermatol.* **121**, 465-474 (2003).

Langmann,T., Porsch-Ozcurumez,M., Heimerl,S., Probst,M., **Moehle,C.**, Taher,M., Borsukova,H., Kielar,D., Kaminski,W.E., Dittrich-Wengenroth,E., & Schmitz,G. Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. *J. Biol. Chem.* **277**, 14443-14450 (2002).

Heimerl,S., Langmann,T., **Moehle,C.**, Mauerer,R., Dean,M., Beil,F.U., von Bergmann,K., & Schmitz,G. Mutations in the human ATP-binding cassette transporters ABCG5 and ABCG8 in sitosterolemia. *Hum. Mutat.* **20**, 151 (2002).

9 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1 Abbildungen

Abb. 1	Differenzierung und Erhaltung des intestinalen Epithels mit den daran beteiligten Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren.....	9
Abb. 2	Darstellung der Schlüsselmoleküle der wingless/β-catenin Signalkaskade.....	11
Abb. 3	Modellvorstellung zur Pathogenese Chronisch Entzündlicher Darmerkrankungen.....	18
Abb. 4	Allgemeiner struktureller Aufbau von Mucin Proteinen.....	22
Abb. 5	RNA Pooling Strategie bei den DNA-Microarray Experimenten	41
Abb. 6	Darstellung der TGFβ/BMP Signalkaskade inklusive der DNA-Microarray Ergebnisse.....	47
Abb. 7	Bestätigung der differentielle Regulation von Mucin Genen bei CED mittels real-time RT-PCR Expressionsanalysen.....	53
Abb. 8	Match TM Analyse von humanen und Maus Mucin Promotorbereichen am Beispiel von MUC5B.....	55
Abb. 9	Composite Module Finder TM Analyse von Mucin Promotoren.....	58
Abb. 10	Relative real-time RT-PCR Expressionsanalysen von Mucinen in LS174T Zellen.....	62
Abb. 11	Chromosomale Lokalisation verschiedener CED Kandidatenloci	63
Abb. 12	Punktwolke der allelischen Diskriminierung des MUC4-A585S Polymorphismus.....	64

9.2 Tabellen

Tabelle 1	Diagnosekriterien für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa	17
Tabelle 2	Patientencharakteristik	29
Tabelle 3	Expressionswerte von Markergenen der Mukosa	42
Tabelle 4	Biostatistische Auswertung der DNA-Microarrays	43
Tabelle 5	Pathway bezogene Auswertung der DNA-Microarray Analyse	46
Tabelle 6	Differentielle Regulation von Genen der wingless/β-catenin, TGFβ/BMP, notch, hedgehog, HNF, CDX2 und GATA4 Signalkaskaden bei CED	48
Tabelle 7	Expression und differentielle Regulation von Mucin Genen bei CED	49
Tabelle 8	Gewebespezifische Expression von Mucin Genen	51
Tabelle 9	Analyse cis-regulatorischer Elemente in der Mucin Promotorsequenz	56
Tabelle 10	Chromosomal Lokalisation der Mucin Gene und der CED Kandidatenloci	64
Tabelle 11	Allelische Diskriminierung von Mucin- und NOD2 SNPs	65
Tabelle 12	Differentielle Regulation von Genen aus mit CED assoziierten Regionen	67
Tabelle 13	Pathway bezogene Auswertung von bei CED differentiell regulierten Genen lokalisiert in CED Kandidatenloci	73
Tabelle 14	TRANSPATH™ Analyse von regulatorischen Genen lokalisiert in CED Kandidatenloci	74

10 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bp	<i>basepair</i>
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CAPE	<i>Caffeic Acid Phenethyl Ester</i>
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
cDNA	copy DNA
cRNA	copy RNA
CU	Colitis ulcerosa
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	fötales Kälberserum
IBD	<i>inflammatory bowel disease</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-Dipeptid
MGB	<i>minor groove binder</i>
MG132	<i>Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal</i>
mRNA	messenger RNA
NFQ	<i>non-fluorescent quencher</i>
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
Tab.	Tabelle
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die in der Danksagung aufgeführten Personen haben mir in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe eines Promotionsberaters oder anderer Personen in Anspruch genommen. Niemand hat von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Christoph Möhle