

Diplomarbeit

**Molekulare Alterationen des Gallensäuretransport und  
Gallensäurenmetabolismus im Kolon bei Colitis ulcerosa**

eingereicht von

**Goran Šućur**

Mat.Nr.: 0211574

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt im

**Labor für experimentelle und molekulare Hepatologie,  
Klinische Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie,  
Medizinische Universitätsklinik Graz**

unter der Anleitung von

**Univ. Doz. Dr. Peter Fickert**

Graz , am 30.9.2009

Goran Šućur

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwende habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 30. September 2009*

Goran Šučur

## Vorwort

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung des mRNA Expressions-Musters von Gallensäuretransportern und Enzymen des Gallensäurenmetabolismus im Kolonepithel bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (CED) im Vergleich zu Darmgesunden. Durch den Vergleich klinischer Daten und histologischer Befunde mit den mRNA Expressions-Mustern konnten positive Korrelationen zwischen Krankheitsstadien und Gallensäuren-Transporter Expression im Darm erkannt werden. Die beobachteten signifikanten Reduktionen der Gallensäuretransporter bei Colitis könnten über therapeutische Modulation in Form einer medikamentösen Steigerung des Gallensäuretransports in neuen Therapiestrategien resultieren.

## Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Michael Trauner, Doz. Dr. Peter Fickert, Dr. Jörg Jahnel, Dr. Emina Halilbasic, Judith Gumhold, Dagmar Silbert, Romana Völkl, Sabine Halsegger, cand. med. dent Slavisa Dujakovic, Dr. Anna Baghdasaryan, Dr. Christian Eberle, cand. med. Elisabeth Eberle und bei Bojan Suzić bedanken.

Besonderer Dank gilt auch meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern, meinem Onkel und meiner Tante und meiner Freundin für das Vertrauen, die Geduld und die Unterstützung, die sie mir gegeben haben - vor allem in schwierigen Zeiten. Ich danke allen, die mich bei meiner Diplomarbeit unterstützten und allen, die bei dieser Dankessagung nicht namentlich genannt sind.

## Zusammenfassung

Die Colitis ulcerosa (CU), eine chronisch entzündliche Darmerkrankung unbekannter Ätiologie, ist durch rezidivierende Entzündungsprozesse der Dickdarm-Schleimhaut mit erhöhter mukosalen Zytokinkonzentration charakterisiert [1]. Die Induktion proinflammatorischer Zytokine könnte in den Kolon-Epithelzellen die mRNA-Expression von Detoxifikationsenzymen und Gallensäuretransporter suppremierieren und in weiterer Konsequenz zu einer gestörten Gallensäure-Rückresorption aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf führen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Biopsien des Colon descendens von CU-Patienten mit akutem Schub mit jenen von gesunden Kontrollpatienten bzw. mit CU-Patienten in Remission verglichen. Neben der mRNA-Expression des Detoxifikations-Enzyms CYP3A4 (Cytochrom-P3A4) wurde die Expression von basolateralen Gallensäure-Transportern (MRP3; Multidrug resistance protein 3, OST $\alpha$  und OST $\beta$ ; Organic solute transporter  $\alpha$  und  $\beta$ ) untersucht. Die Expression von iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase) diente als Positivkontrolle. Schließlich wurden Korrelationen der Ergebnisse mit klinisch-anamnestischen Daten durchgeführt.

Für die untersuchten Gallensäuretransporter MRP3, OST $\alpha$  und OST $\beta$  bestand eine signifikante mRNA-Expressions-Suppression bei Patienten mit Pancolitis, während bei Patienten mit akuter Entzündung von einem Kolon-Teilstück nur die OST $\alpha$ -mRNA-Expression suppremiert vorlag. Alle untersuchten Transporter zeigten in der Remissions-Phase verringerte mRNA-Expressions-Muster, jedoch waren die Veränderungen nicht signifikant. iNOS war nur bei Patienten mit Pancolitis signifikant erhöht. Die Rolle des Detoxifikationsenzym CYP3A4 kann aufgrund großer Schwankungen nicht beurteilt werden.

Aus unseren Ergebnissen kann man schließen, dass es während eines Schubs bei CU zur Unterdrückung von Gallensäure-Export-Transportern kommt. Dies könnte zur erhöhten intrazellulären Gallensäurenkonzentration führen. Im Gegensatz dazu kommt es in der Remissionphase zur Normalisierung der Expressions-Muster.

Eine medikamentöse Steigerung der Expression von Gallensäuretransporter könnte einen positiven Einfluss auf den Verlauf bei CU haben.

## Abstract

Ulcerative colitis (UC) represents a chronic inflammatory bowel diseases of unknown origin with elevated tissue levels of cytokines and chemokines [1], which may repress the mRNA levels of intestinal bile acid transporters and enzymes. Consequently this may lead to disturbed bile acid reabsorption from the intestine into blood.

To test the hypothesis whether impaired intestinal bile acid transport or metabolism may be related to the disease course of CU, we compared colonic mRNA expression levels in colon biopsies of UC patients to healthy controls. In addition to the mRNA-expression levels of the detoxification enzyme CYP3A4 (cytochrome P3A4) we also analyzed the basolateral bile acid transporters (MRP3, multidrug resistance protein 3, OST $\alpha$  and OST $\beta$ ; organic solute transporter  $\alpha$  and  $\beta$ ) and iNOS (inductible nitric oxide synthase), which served as positive control. In addition, we correlated clinical data, medical and drug history with mRNA expression levels.

mRNA expression levels of 3 bile acid transporters (MRP3, OST $\alpha$  and OST $\beta$ ) were significantly reduced in patients with pancolitis. In patients with left sided inflammation we observed the suppression of OST $\alpha$ . In remission phase all transporters appeared to have reduced expression patterns, however, these changes did not reach statistical significance. The positive control in terms of iNOS was significantly elevated in patients with pancolitis. The detoxification enzyme CYP3A4 showed large variations.

We conclude that during acute UC the expression of bile acid export transporters in the colon is reduced and may play a role in the pathogenesis of UC. mRNA-expression-patterns returned to normal levels during the remission phase. Taken together our findings may point to a potential pathogenetic role of bile acid transporter alterations in CU.

## Inhaltsverzeichnis:

Vorwort.....	iii
Danksagungen .....	iii
Zusammenfassung .....	iv
Abstract .....	vi
Glossar und Abkürzungen .....	viii
Abbildungsverzeichnis.....	x
Tabellenverzeichnis:.....	x
1) Einleitung .....	1
1.1) Colitis Ulcerosa.....	1
1.1.1) Definition .....	1
1.1.2) Ätiologie und Pathogenese .....	1
1.1.3) Verlauf, Klinisches Bild und Komplikationen .....	2
1.1.4) Therapie .....	3
1.2) Gallensäuren .....	4
1.2.1) Physiologische Grundlage .....	4
1.3) Gallensäuretransport im Ileum und Kolon.....	5
2) Material und Methoden .....	7
2.1) Kolorektoskopie mit Biopsien.....	7
2.2) Zusammenstellung eines homogenen Patienten-Kollektivs.....	7
2.3) Patientencharakterisierung: .....	8
2.4) Auswertung der Proben mittels RT-PCR .....	9
2.4.1) RNA-Isolation .....	9
2.4.2) cDNA-Synthese.....	10
2.4.3) Realtime PCR .....	10
2.5) Auswertung und Statistik .....	11
3) Resultate .....	12
3.1) Klinische Daten der PatientInnen: .....	12
3.2) Medikamentöse Begleittherapie: .....	13
3.3) Laborwerte:.....	13
3.4) Expressionsmuster: .....	13
3.4.1.) Positiv-Kontrolle .....	14
3.4.2.) Gallensäuretransporter .....	14
3.4.3.) Detoxifikationsenzym CYP3A4.....	15
3.5) Ergebnisse der Expressionsstudien:.....	16
4) Diskussion.....	17
5) Literaturverzeichnis .....	20
Anhang 1 –Projektplan .....	31
Anhang 2 - Datenblatt zur Studie .....	32
Anhang 3 - Patienteninformation .....	33
Lebenslauf.....	37

## Glossar und Abkürzungen

<b>A. dest.</b>	Aqua destillata (= destilliertes Wasser)
<b>ASBT</b>	Apical sodium dependent bile acid transporter
<b>CDCS</b>	Chenodeoxycholsäure
<b>cDNA</b>	Complementary deoxyribonucleic acid
<b>CED</b>	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
<b>CS</b>	Cholsäure
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CU</b>	Colitis ulcerosa
<b>CYP3A4</b>	Cytochrom-P450 3A4
<b>DALM</b>	Dysplasie assoziierte Läsionen oder Masse
<b>DCS</b>	Deoxycholsäure
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid (= Desoxyribonukleinsäure)
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
<b>GS</b>	Gallensäuren
<b>IBD</b>	Inflammatory bowel disease (= CED)
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Gamma-Interferon
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	Inductible Nitric Oxide Synthase
<b>LCS</b>	Lithocholsäure
<b>LKH</b>	Landeskrankenhaus
<b>MC</b>	Morbus Crohn
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MRP3</b>	Multidrug resistance protein 3
<b>NPCU</b>	„Nicht Pancolitis ulcerosa“
<b>Oligo dT</b>	Oligo deoxy-Thymin
<b>OST<math>\alpha</math></b>	Organic solute transporter alpha
<b>OST<math>\beta</math></b>	Organic solute transporter beta
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction

<b>PCU</b>	Pancolitis ulcerosa
<b>PSC</b>	Primär sklerosierende Cholangitis
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RT-PCR</b>	Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
<b>SLC</b>	Solute carrier
<b>T<sub>H</sub></b>	T-Helfer-Zellen
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>UC</b>	Ulcerative colitis ( = Colitis ulcerosa)
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>ZMF</b>	Zentrum für medizinische Forschung Graz

## **Abbildungsverzeichnis:**

**Abbildung 1:** Enterohepatischer Kreislauf

**Seite 23**

## **Tabellenverzeichnis:**

**Tabelle 1:** Ein- und Ausschlusskriterien

**Seite 24**

**Tabelle 2:** Patienten

**Seite 25**

**Tabelle 3:** Patientencharakterisierung

**Seite 26**

**Tabelle 4:** Material und Methoden

**Seite 27**

**Tabelle 5:** Medikation vor Koloskopie

**Seite 28**

**Tabelle 6a:** CRP-Laborwerte

**Seite 29**

**Tabelle 6b:** Leukozyten-Werte

**Seite 29**

**Tabelle 7:** Expressionsmuster

**Seite 30**

# 1) Einleitung

## 1.1) *Colitis Ulcerosa*

### 1.1.1) Definition

Colitis Ulcerosa (CU) ist eine in Schüben verlaufende, chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED). Im Gegensatz zu Morbus Crohn (MC) breitet sich bei CU die Entzündung kontinuierlich vom Rektum nach oral aus und ist auf die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa) beschränkt. Bei etwa 40% aller CU Patienten liegt eine Entzündung des Rektums (Proktitis) und Kolon sigmoideums (Proktosigmoiditis) vor. Bei ca. 20% ist eine Pancolitis (PCU) vorliegend [2], in seltenen Fällen ist der Befall bis ins terminale Ileum („backwash Ileitis“) möglich. Unter „Remission“ versteht man eine inaktive Phase ohne Beschwerden zwischen akuten Schüben (siehe unten).

### 1.1.2) Ätiologie und Pathogenese

#### 1.1.2.1) Ätiologie

Die Ätiologie und Pathogenese der CU sind nur zum Teil bekannt. In den letzten Jahren wurde erkannt, dass es nicht nur einen Auslöser für die Erkrankung gibt, sondern dass es sich um ein Zusammenspiel mehrerer genetischer, immunologischer und mikrobieller Faktoren bei Vorliegen gewisser Umweltfaktoren handelt [3], [4].

Auf genetischen Einfluss weisen familiäre Häufungen und Zwillingsstudien hin. Für Verwandte ersten Grades ist das Erkrankungsrisiko 7 bis 15mal erhöht [5]. Die Konkordanzrate für monozygote Zwillinge liegt bei 6% [6]. Studien zeigten, dass auch die Prävalenz bei afroamerikanischen und asiatischen Bevölkerungsgruppen deutlich niedriger als bei weißen liegt und dass Juden häufiger als Nichtjuden betroffen sind [7]. Verschiedene Gene werden als „Suszeptibilität-Gene“ für CED gehandelt: Klasse I - und Klasse II-Gene des

Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA), Gene für den T-Zell-Rezeptorkomplex, für den Komplementprotein C3, für den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, für den Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), für das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und für das Peptidtransportermolekül ABCB3 [7]. Bis jetzt wurden vier Suszeptibilitätsloci erkannt: IBD2 (inflammatory bowel disease2), das am Chromosom 12q liegt [8], [9], [10], IBD3 am Chromosom 6p [11], [12], IBD6 am Chromosom 19q [12] und IBD 7 am Chromosom 1p [13].

Auch Umweltfaktoren – wie Nikotinabusus, Ernährung, Hygiene, Klima, Umweltverschmutzung, Streß, Antiphlogistika- und Antibiotika-Einnahme – könnten einen Einfluß auf die Pathogenese von CU haben [14].

### **1.1.2.2) Pathogenese**

Direkt in der Darmschleimhaut befinden sich jene Entzündungszellen, die in der Pathogenese der CU eine Schlüsselrolle spielen dürften. Bei CU kommt es durch eine gesteigerte Aktivierung von Neutrophilen und Makrophagen - als Reaktion auf ein bisher unbekanntes luminales Agens (event. Bestandteile von Bakterien oder Viren) – zur Ausschüttung von einer Vielzahl von Mediatoren (Prostaglandine, Leukotriene, plättchenaktivierende Faktoren, Sauerstoffradikale), wodurch intestinale Epithelzellen zerstört werden und es zur allgemeinen Entzündungsreaktion des Bindegewebes kommt. Nach dieser „unspezifischen“ Immunantwort wird auch das „spezifische“ Immunsystem (verschiedene Lymphozyten) aktiviert. CU-Patienten zeigen mit vermehrter Produktion von Interleukin-4, Interleukin-5 und Interleukin-10 ein T<sub>H</sub>-2-typisches Zytokinmuster [15], [16], [17].

### **1.1.3) Verlauf, Klinisches Bild und Komplikationen**

Der Beginn der Erkrankung kann schleichend oder perakut sein. Der Verlauf kann chronisch rezidivierend (mit Remissionsphasen von Wochen, Monaten, oder bis zu Jahren), chronisch aktiv (mit nur teilweiser Remission oder Remission die nur unter Steroidtherapie erreicht wird) oder fulminant sein. Die Klinik steht in engem Zusammenhang mit der Ausdehnung und Aktivität.

Charakteristisch sind gastrointestinale Symptome (blutig schleimige Durchfälle, Krämpfe, Bauchschmerzen), Fieber und extraintestinale Symptome. Extraintestinal assoziiert sind mit CU Erkrankungen der Haut (Aphten, Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), der Augen (Iritis, Uveitis, Episkleritis), der Leber (primär sklerosierende Cholangitis; PSC), der Gelenke (Arthritis, ankylosierende Spondylitis) und der Knochen (Osteoporose) [18].

Zu den Komplikationen der CU gehören Wachstumsstörungen im Kindesalter, Gewichtsverlust, Darm-Blutungen mit konsekutiver Blutungsanämie, Perforationen und das toxisches Megakolon [18]. Als toxisches Megacolon bezeichnet man eine Dilatation eines Kolonabschnittes über 6 cm, welches sich bei ca. 5% aller CU-Patienten im schweren Schub (charakterisiert durch Fieber, Leukozytose, Anämie, Tachykardie, Hypotonie, schweres Krankheitsgefühl) entwickelt [19]. Weitere Komplikationen der CU sind DALM (Dysplasie-assoziierte Läsion/Masse) und das Kolonkarzinom. Aufgrund eines erhöhten Entartungsrisikos ist eine Überwachungskoloskopie mit Stufenbiopsien alle 1-2 Jahre bei bekannter CU (mit Krankheitsdauer länger als 10 Jahren) obligat [20], [21], [22], [23], [24].

#### **1.1.4) Therapie**

Zur Therapie einer Proktitis, Proktosigmoiditis oder einer klinisch-geringgradigen Colitis wird Mesalazin (Retardpräparat der 5-Aminosalicylsäure) - eventuell in Kombination mit einem Antibiotikum (Metronidazol oder Ciprofloxazin) - verwendet. Zur Therapie eines mäßiggradigen bis schweren Schubes sind topische oder systemisch-wirksame Kortikosteroide geeignet (z.B. Prednisolon) [25]. Bei einem schweren, fulminanten Schub ist die zusätzliche Gabe eines Immunsupresivums notwendig (z.B. Ciclosporin A, FK 506) [26]. Zur Aufrechterhaltung der Remission wird Azathioprin eingesetzt [27]. Die Wirksamkeit von sogenannten „Biologika“ (z.B. der TNF $\alpha$ -Antikörper) ist bei CU geringer als bei MC [28], [29]. Eine akute Operations-Indikation besteht bei fulminanter Colitis mit Sepsis, toxischem Megakolon, Perforation oder bei schweren Blutungen. Bei

schweren rezidivierenden Schüben, bei Epitheldysplasie und bei Kontraindikationen gegen eine medikamentöse Langzeittherapie sollte eine elektive Kolektomie überlegt werden [25]. Insgesamt erfordert das Management und die Therapie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen aufgrund der Komplexität einen hohen Erfahrungsgrad und interdisziplinären Zugang (Innere Medizin – Radiologie – Chirurgie) und sollte bei schwierigen/komplexen Fällen Spezialisten vorbehalten sein. Eine detaillierte Darstellung der Therapie von CED würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

## **1.2) Gallensäuren**

### **1.2.1) Physiologische Grundlage**

Die Synthese von Gallensäuren (GS) aus Cholesterin und deren Ausscheidung über die Galle sind beim Menschen die wichtigsten Abbauege des Cholesterins. Die Synthese von GS erfolgt durch die Umwandlung von Cholesterin zu 7 $\alpha$ -Hydroxycholesterin durch die 7 $\alpha$ -Hydroxylase (CYP7A1) („klassischer Weg“) oder durch eine 7 $\alpha$ -Hydroxylierung von Oxysterolen („alternativer Weg“) [30]. Die „primären“ GS, Cholsäure (CS) und Chenodeoxycholsäure (CDCS), werden vor der biliären Sekretion mit den Aminosäuren Glycin und Taurin konjugiert. Durch Bakterien der Darmflora wird ein kleiner Teil der primären GS dekonjugiert und „sekundäre“ GS genannt. So entsteht aus CS Deoxycholsäure (DCS) und aus CDCS Litocholsäure (LCS) [31], [32], [33].

Die Galle, die neben GS, auch Bilirubin, Cholesterin, Phospholipide, Elektrolyte und Wasser enthält, wird postprandial unter Vermittlung von Cholezystokinin und Motilin ins Duodenum sezerniert. Im Dünndarm sind GS für die Aufnahme von Fetten, fettlöslichen Vitaminen (A, D, E, K) und anderen lipophilen Substanzen notwendig [33]. Im distalen Teil des Ileums wird der größte Teil (bis 95%) der GS aktiv mit Hilfe von einem speziellen Transportsystem (siehe unten) rückresorbiert. Im Kolon hingegen kann die Aufnahme in die Epithelzelle nur passiv erfolgen [34]. Die Abgabe von der Darmzelle ins Blut erfolgt ebenfalls aktiv.

Über die Pfortader erreichen die GS die Leber, wo sie von den Hepatozyten wieder aktiv aufgenommen werden können. Dort werden sie erneut konjugiert und in die Galle ausgeschieden. Dieser sogenannter „enterohepatischer Kreislauf“ wird täglich

3-10 mal wiederholt (Abbildung 1). Nur ca. 5% der GS werden mit dem Stuhl ausgeschieden [33], [35].

### **1.3) Gallensäuretransport im Ileum und Kolon**

Der enterohepatische Kreislauf wird durch spezielle Transport-Proteine ermöglicht. Im Ileum nimmt das an der apikalen Membran lokalisierte Transportsystem ASBT/SLC10A2 (apical sodium dependent bile acid transporter) Gallensäuren in den Enterozyten auf [36], [37]. Der basolaterale Gallensäureefflux vom Enterozyten ins portalvenöse Blut erfolgt über MRP3 (multidrug resistance Protein 3) und den heterodimeren Transporter OST $\alpha$ /OST $\beta$  (organic solute transporter) [38]. Diese Transporter sind ebenfalls in der Kolon-Epithelzelle vorhanden während ASBT dort nicht exprimiert wird [35]. Bei Dünndarmerkrankungen (z.B. MC) erreichen mehr GS das Kolon, wobei bei einer Gallensäurenkonzentration über einer kritischen Menge (3 mmol) die passive Rückresorption nicht mehr ausreicht und eine durch die sekretorische Wirkung von Gallensäuren auf das Kolonepithel bedingte Diarrhoe entstehen kann.

Da der Gastrointestinaltrakt im besonderen Maße Endo- und Xenobiotika ausgesetzt ist, befindet sich ein vielseitiges Entgiftungs- („Detoxifikations“) System im Darm [39], [40], [41]. Der Detoxifikations-Prozeß wird in „3 Phasen“ gegliedert. Dabei spielt die Hydroxylierung mit Hilfe von Cytochrome-P450 Enzymen (z.B. CYP3A4), eine wichtige Rolle, die als Phase I bezeichnet wird. Sowohl verschiedene Tierexperimente als auch Studien an Patienten zeigten, dass eine herabgesetzte Expression von Detoxifikations-Enzymen der Phase I und II eine Rolle in der Initialisierung und Progression der CU spielen könnten [42], [43].

Bisher wurde die Beeinflussung der Gallensäuretransporter im Kolon durch eine Colitis nicht untersucht. Diese Arbeit basierte auf der Hypothese, dass es

während einer akuten Darm-Entzündung bei Patienten mit CU zu einer erhöhten intrazellulären Gallensäurenkonzentration durch Niederregulation der Expression von Transporterproteinen kommen könnte. Die Überschreitung einer toxischen Konzentration könnte sämtliche Funktionen der Darmzelle (u.a. Entgiftungs-, Abwehr-, Barriere- oder Transportfunktion) dermaßen beeinflussen, dass es zum Zelluntergang mit konsekutiver Verstärkung der Entzündung kommen könnte. Ursächlich dafür könnte eine negative Wirkung von Zytokinen auf die Expression von Gallensäuretransportern im Kolon sein.

## **2) Material und Methoden**

### **2.1) Kolorektoskopie mit Biopsien**

Diese Diplomarbeit ist Teil einer größeren Fall-Kontrollstudie, die an der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt wird. Während bei einer weiteren, parallel durchgeführten Diplomarbeit MC-Patienten untersucht wurden, wurden in diese Diplomarbeit Patienten mit CU- und Kontroll-Patienten eingeschlossen. Dafür mussten primär potentielle Studienkandidaten anhand des Endoskopieplanes identifiziert und anschließend anhand der Ein- und Ausschluss-Kriterien (siehe Tabelle 1) rekrutiert werden. Patient/Innen, die die Einschlusskriterien erfüllten, wurden im Rahmen des Aufklärungsgesprächs zur Koloskopie vom behandelten Oberarzt auf das Forschungsprojekt hingewiesen und zur Teilnahme an dieser Studie eingeladen.

Während der Koloskopie wurden zusätzlich zu den routinemäßig entnommenen Darmbiopsien jeweils zwei Biopsien aus dem Ileum, C. ascendens und descendens entnommen und unmittelbar nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff bei ca.  $-190^{\circ}\text{C}$  gelagert. Entnahmen von Biopsien im Rahmen des Studienprotokolls wurden ausschließlich nach Erhalt einer schriftlichen Einverständniserklärung durchgeführt. Ein positives Ethikkomiteevotum (EK Nr. 12-159 ex 01/02) der Medizinischen Unversitätsklinik zu diesem Vorgehen liegt vor.

### **2.2) Zusammenstellung eines homogenen Patienten-Kollektivs**

Im Zeitraum unserer Studie wurden 137 Patienten koloskopiert, die die Ein- und Ausschluss-Kriterien erfüllten (Tabelle 2). Davon wurde bei 31 Patienten MC und bei 14 Patienten CU diagnostiziert, zusätzlich wurden für diese Diplomarbeit 9 Kontrollpatienten ausgewählt, die im Alter mit den CU-Patienten vergleichbar waren und bei denen keine Grunderkrankungen vorhanden waren. Ein Patient

wurde aufgrund des Verdachts einer Graft versus host disease koloskopiert, bei 1 Patienten wurde eine lymphozytäre, bei 1 Patienten eine kollagene und bei 3 eine infektiöse Kolitis diagnostiziert. Bei 4 Patienten wurde laut Koloskopie-Befunde CU diagnostiziert, aber wegen diskontinuierlichen Befallsmusters wurden diese Patienten aus der Studie ausgeschlossen. Bei keinem von diesen 4 Patienten war das Colon descendens betroffen. Bei einem Patienten wurde eine CU-Proktitis diagnostiziert. Für 22 Patienten waren die Histologie-Befunde oder Arztbriefen im Daten-Verarbeitungsprogrammes „Medocs“ nicht vorhanden, 16 Patienten wurden wegen unpassendem Alter aus der Studie ausgeschlossen. Weitere 35 Patienten erfüllten die Kontrollgruppen-Einschlusskriterien, aber aufgrund kleiner Patientenzahlen in den verschiedenen Remissions-Gruppen, entschieden wir uns die 9 ausgesuchten Patienten in die Studie zu inkludieren. Die Proben der Patienten, die nicht in die Studie eingeschlossen waren, wurden kodiert und verschlüsselt gelagert.

Die insgesamt 23 Patienten wurden in 4 möglichst homogene Patientengruppen (anhand der koloskopischen und histologischen Befunde) eingeteilt: die Kontrollgruppe beinhaltet Patienten, die nicht an entzündlichen Darmerkrankungen litten (n=9), sondern sich einer Kolonkarzinom-Screening-Untersuchung unterzogen haben oder an unklaren Bauchschmerzen ohne morphologischem Korrelat litten, bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Patienten mit akuter Pancolitis („PCU“; n=5). Patienten der dritten Gruppe sind Patienten mit akuter Colitis von nur einem Kolon-Teilstück („Non pancolitis; NPCU“; n=4). Die dritte Patientengruppe besteht aus Patienten mit CU in der Remissionsphase („CU in Remission“; n=5).

### **2.3) Patientencharakterisierung:**

Für jeden Patient wurde ein separates Datenerhebungsblatt angelegt. Auf dieses wurden sowohl anamnestische Daten (Beginn der Beschwerden, Ergebnisse von Voruntersuchungen, aktuelle Medikation, BMI etc.), laborchemische Daten (Serum-CRP Werte, Leukozytenzahl etc.) als auch die makroskopischen und mikroskopischen Ergebnisse der Koloskopie

zusammengefasst (Tabelle 3). Die Datenerhebung erfolgte mit Hilfe des Daten-Verarbeitungsprogrammes „Medocs“.

## **2.4) Auswertung der Proben mittels RT-PCR**

Im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz (ZMF) wurde aus den Darm-Biopsien RNA isoliert, komplementäre DNA Synthese durchgeführt und daraus mit Hilfe der quantitativen RT-PCR Methode unter Bezugnahme auf ein „Housekeeping-Gen“ (GAPDH) relevante Expressionen von Gallensäure-Transporter (siehe oben) bestimmt (Tabelle 4). Die Proben wurden kodiert und nach Abschluss der Analytik verschlüsselt gelagert.

### **2.4.1) RNA-Isolation**

Voraussetzung für die RNA-Isolation war die Desinfektion der Arbeitsfläche mit 70%igem Alkohol und die Reinigung der benötigten Utensilien (Stössel, Mörser, Schälchen etc.) mit Aceton. RNA-Reste auf Pipetten wurden mit Hilfe des UV-Crosslinker<sup>®</sup> quervernetzt. Die bei der Koloskopie gewonnenen und bis zur Analyse in flüssigen Stickstoff tiefgefrorenen Gewebeproben (siehe oben) wurden in Eppis mit Hilfe von Plastikstößel homogenisiert und primär mit 800µl Tri-Reagent und 160µl Chloroform versetzt. Anschließend - nach einer gleichmäßigen Durchmischung über 15 min mittels Drehscheibe - mit 70%-igen Alkohol und Isopropanol versetzt, wodurch nach 20-minütigen Zentrifugieren in der obersten der 3 Phasen RNA (DNA in mittleren Schicht) abzuheben war. Nach einem Reinigungsschritt mit Isopropanol wurde das RNA-Pellet mit Aqua dest gelöst. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch vermessen. Die Qualität der RNAs wurde mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese (Vergleich 18s und 28s Banden) bestimmt.

### 2.4.2) cDNA-Synthese

Als Vorlage für die cDNA (complementary DNA) dient die isolierte, einsträngige RNA, an deren Ende ein Poly-Adenin-Strang hängt. Um einen komplementären DNA-Strang bilden zu können, muss zur Probe der „Oligo dT Primer“ hinzugefügt werden, der aus der zu Adenin komplementären Base Thymin besteht. Es kann sich dadurch am Ende des RNA-Stranges ein Stück Doppelstrang bilden, an dem – nach Hinzufügen vom Enzym „Reverse Transcriptase“ - Nukleotide (sog. „dNTP“) binden können.

Anhand der Gebrauchsanweisung des Herstellers (Invitrogen, Austria) wurde die gesamte RNA in Abhängigkeit vom Expressionsniveau der Gene im Gewebe transkribiert. Dafür wurde zur RNA (etwa 1,5 µg RNA, mindestens 0,5 µg) ein randomisierter Hexamer und A. dest. zugegeben (siehe Tabelle 4).

### 2.4.3) Realtime PCR

Die RT-PCR (Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die zusätzlich zur herkömmlichen PCR-Methode die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden (daher der Name „Real Time“). Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu.

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup>- und SYBR<sup>®</sup>Green Verfahrens auf dem AB7900HT von Applied Biosystems durchgeführt. TaqMan<sup>®</sup>-Proben (MWG Biotech AG, Deutschland) sind so konzipiert, dass 2 unterschiedliche Primer an den jeweiligen Enden der gesuchten DNA-Sequenz eines Gens binden. Diese Primer sind spezielle Oligonukleotide, deren 5'-Ende mit einem fluoreszenten „Reporter“-Farbstoff (6-Carboxyfluoreszein- hohe Energie) und deren 3'-Ende mit einem „Quencher“-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin- niedrige Energie) markiert sind. Während eines jeden PCR-Zyklus erfolgt eine Sequenzverlängerung mittels Taq-Polymerase und

dadurch wird der Abstand zwischen dem Reporter und Quencher größer und das Signal stärker. Diese Signale werden mit Hilfe des „Sequence Detectors“ im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst und mittels spezieller Software ausgewertet [44]. Bei der SYBR<sup>®</sup> Green Methode arbeitet man ebenfalls mit 2 Primern, jedoch verwendet man einen speziellen, grünlichen Fluoreszenzfarbstoff (der sogenannte SYBR<sup>®</sup>Green), der Nukleinsäuren-spezifisch (und nicht Sequenz-spezifisch) an der gebildeten doppelsträngigen DNA bindet und dadurch stärker als freier Farbstoff fluoresziert.[45].

## ***2.5) Auswertung und Statistik***

Die erhaltenen Daten wurden primär auf eine Normal-Verteilung mittels Shapiro Wilks Test geprüft. Für den Vergleich zweier Gruppen wurden verschiedene Variablen (z.B. MRP3) mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ein p-Wert unterhalb 0,05 wurde als signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines PC-Software-Programmes (SPSS).

### 3) Resultate

#### 3.1) *Klinische Daten der PatientInnen:*

Wie in 2.2. erwähnt, inkludierten wir 23 PatientInnen in diese Arbeit und teilten sie aufgrund des Befall-Musters der Darmentzündung während der Biopsie-Entnahme in vier Gruppen ein: Kontrollgruppe, PCU, NPCU und CU in Remission. Primär verglichen wir klinische Daten der Patienten (Geschlecht, Alter, Koloskopie-Indikation, Leitsymptome, Begleiterkrankungen) miteinander (Tabelle 3).

Dabei zeigte sich, dass alle PCU Patienten männlich waren. Ein ähnliches Bild stellte sich in der Remission-Gruppe dar (vier Männer und eine Frau), hingegen war die Geschlechtsverteilung bei NPCU-Patienten ausgeglichen (2:2). Unsere Kontrollgruppe beinhaltete 4 männliche und 5 weibliche Patienten. Das Alter der untersuchten CU-Patienten war zum Zeitpunkt der Erstdiagnose  $33\pm 18$  und zum Zeitpunkt der Koloskopie während der Studie  $43\pm 18$  Jahre. Das Kontrollkollektiv beinhaltete Patienten, die zum Zeitpunkt der Koloskopie nicht älter als 47 Jahre alt waren.

Die häufigste Indikation zur Koloskopie war der Verdacht auf einen akuten Schub bei bekannter CU mit zunehmenden abdominellen Beschwerden. Ein Großteil dieser Patienten ( $n=4$ ) hatte eine Pancolitis. Bei einem Patienten wurde durch die Koloskopie die Erstdiagnose einer CU gestellt. Alle Patienten der Remissions-Gruppe unterzogen sich einer routinemäßigen Surveillance-Kontrollkoloskopie ohne aktuelle gastrointestinale Beschwerden. Die Indikationen zur Koloskopie bei den Kontroll-Patienten waren unklare, rezidivierende abdominelle Beschwerden, Kolonkarzinom-Screening-Untersuchung, Anämieabklärung, Bauchschmerzen, unklares Fieber bei Diarrhö, Stuhunregelmäßigkeiten in Sinne von Diarrhö, Meläna oder Hämatochezie.

Das Leitsymptom der Patienten mit aktiver Entzündung war Stuhunregelmäßigkeit (Diarrhö mit Stuhlfrequenz bis 20x/Tag und Hämatochezie).

Alle Patienten in der Remissions-Gruppe waren beschwerdefrei, während die Symptomaten in der Kontrollgruppe den Koloskopie-Indikationen entsprach. Bei den Begleiterkrankungen trat in der PCU-Gruppe gehäuft Eisenmangel auf, in der NPCU-Gruppe litt je ein Patient an PSC bzw. an Osteoporose.

### **3.2) Medikamentöse Begleittherapie:**

In Tabelle 5 ist zu sehen, dass die eingeschlossenen Patienten sehr unterschiedlich therapiert wurden.

### **3.3) Laborwerte:**

Wir untersuchten als relevante Entzündungswerte im Blut den CRP-Wert und die Leukozytenzahlen, um eine eventuelle Korrelation zwischen dem Schweregrad der Entzündung und den mRNA-Expressionswerten herstellen zu können (Tabelle 6). Sowohl die Kontrollgruppe als auch die Remissions-Patienten zeigten CRP Werte im Normalbereich (Normbereich CRP < 8). Zu erwähnen ist, dass 2 Patienten der Kontrollgruppe einen erhöhten CRP-Wert aufgrund einer Cholezystitis bzw. einer Gastritis vorwiesen – diese Werte wurden nicht bei der Erstellung der Tabelle verwendet. Interessant war, dass die NPCU-Patienten im Durchschnitt höhere CRP-Werte als die PCU-Patienten zeigten. Jedoch waren nur die PCU-Werte signifikant erhöht. Insgesamt zeigte sich bei keinem Patienten ein stark erhöhter CRP-Wert (der höchste CRP-Wert war 56). Die Leukozytenzahlen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe nur bei den PCU Patienten signifikant erhöht.

### **3.4) Expressionsmuster:**

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der mRNA-Expressions-Analysen zusammengefasst. Die Expressionen der einzelnen Transporter wurden unter Bezugnahme auf das „Housekeeping-Gen“ GAPDH ausgedrückt. Die Expressionen von GAPDH zeigten bei allen Patienten vergleichbare Werte. Ein

Patient der PCU-Gruppe hatte eine leicht erhöhte – aber nicht signifikante - GAPDH-mRNA-Expression. Interessanterweise waren auch bei diesem Patienten OST $\alpha$ -, OST $\beta$ - und CYP3A4-Werte im Vergleich zu anderen Patienten der PCU-Gruppe erhöht. Bei Durchsicht der klinischen Daten zeigte sich, dass dieser Patient kurz vor der Koloskopie mit dem TNF $\alpha$ -Blocker Remicade<sup>®</sup> therapiert wurde.

### **3.4.1.) Positiv-Kontrolle**

Als Positiv-Kontrolle für unsere Studie verwendeten wir iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase). iNOS war in der PCU-Gruppe sowohl im Vergleich zur Kontroll- als auch zur Remissions-Gruppe signifikant erhöht. Obwohl die Werte auch in der NPCU-Gruppe deutlich erhöht waren, konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden. Grund dafür war, dass es bei zwei untersuchten Patienten zu keiner erhöhten iNOS-mRNA-Expressionen kam. Einer dieser Patienten zeigte histologisch nur eine mittelgradige Entzündung in einem Teil des Colon descendens bei normalen Leukozyten- und CRP-Werten. Der zweite Patient zeigte ebenfalls nur eine gering- bis mittelgradige Entzündung im Colon descendens und Colon transversum. In der Remission-Gruppe war iNOS signifikant niedriger als in der Kontroll-Gruppe.

### **3.4.2.) Gallensäuretransporter**

#### **3.4.2.1.) MRP3**

Signifikant erniedrigt zeigte sich die MRP3-mRNA-Expression in der PCU-Gruppe im Vergleich zu Patienten der Kontrollgruppe – aber auch im Vergleich zur Remissions-Gruppe. In der NPCU-Gruppe kam es zu einer Suppression der MRP3-mRNA-Expression und in der Remission-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe die aber keine statistische Signifikanz erreichte.

#### **3.4.2.2.) OST $\alpha$**

Die OST $\alpha$ -mRNA-Expression wurde sowohl in der PCU- als auch in der NPCU-Gruppe in Bezug auf die Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt beobachtet. In der Remissions-Gruppe wurde eine verminderte OST $\alpha$ -mRNA-Expression festgestellt, jedoch war diese nicht signifikant in Bezug auf die anderen Gruppen.

#### **3.4.2.3.) OST $\beta$**

Es wurde eine signifikante Suppression von OST $\beta$  sowohl von der PCU-Gruppe in Bezug auf die Kontrollgruppe als auch auf die Remissions-Gruppe beobachtet. Die NPCU- und die Remissions-Patienten zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### **3.4.3.) Detoxifikationsenzym CYP3A4**

Die CYP3A4-mRNA-Expression war in der PCU-Gruppe signifikant reduziert, nachdem ein Patient ausgeschlossen wurde. Dieser Patient zeigte einen extrem hohen Wert in der RT-PCR (hundert-fach erhöht im Vergleich zu Werten anderer PCU-Patienten) In den anderen Gruppen waren die Mittelwerte der CYP3A4-Expressionen zwar erniedrigt, jedoch zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

### **3.5) Ergebnisse der Expressionsstudien:**

Diese Studie zeigte eine Suppression der Expression für alle 3 untersuchten Gallensäure-Export-Transporter (MRP3, OST $\alpha$  und OST $\beta$ ) in der PCU-Gruppe im Bezug auf die Kontrollgruppe, während in der NPCU nur die Werte der OST $\alpha$ -Expression niedriger als in der Kontrollgruppe waren. MRP3- und OST $\beta$ -Werte waren in der PCU-Gruppe auch im Bezug auf die Remissions-Gruppe signifikant erniedrigt. Die Rolle des Detoxifikationsenzym CYP3A4 kann aufgrund großer Schwankungen nicht beurteilt werden. Bei Patienten in der Remissionsphase zeigte sich eine Normalisierung der Werte.

## 4) Diskussion

Die vorliegende Untersuchung hatte das Ziel, molekulare Veränderungen des Gallensäuretransports und –metabolismus im Kolon bei verschiedenen Stadien von CU zu untersuchen. Diese Studie konnte zeigen, dass die Expression von Gallensäure-Export-Transportern während eines Schubs bei CU niederreguliert und in der Remissionsphase normalisiert wird.

Studienmaterial dieser Arbeit waren Kolon-Biopsate von Patienten, die sich einer Koloskopie unterzogen haben. Bei Erstellung unserer Patientengruppen achteten wir auf möglichst homogene Patientengruppenbildung. Diese Bestrebung wurde durch unterschiedliches Alter, Geschlecht und Begleitmedikamente sowie unterschiedliche Krankheitsverläufe erschwert. Um die dadurch bedingten interindividuelle Variabilität zu vermindern, wären im günstigsten Fall nur Patienten mit CU-Erstdiagnose zu inkludieren. Die geringe Inzidenz würde aber den Untersuchungszeitraum der für eine solche Studie nötig wäre stark verlängern. Zudem wurde die Erstdiagnose der CU häufig nicht in unserem Zentrum gestellt. Ein weiterer Lösungsvorschlag für dieses Problem wäre diese Studie bei Kindern durchzuführen, da pädiatrische Koloskopien beinahe ausschließlich an der Universitätsklinik erfolgen und die Inzidenz der CED bei Kindern stark zunimmt. Zusätzlich würde der Vorteil bestehen, dass keine Begleit- oder Vorerkrankungen bzw. Begleitmedikamente vorliegen.

Wir erwarteten bei unserer Studie eine Suppression der mRNA-Expressionen der Transporter. Daher verwendeten wir ein Gen zur Positiv-Kontrolle mit eindeutiger Expressions-Steigerung bei Entzündung. Wir entschieden uns für den Entzündungsmarker iNOS. Tatsächlich konnten wir sowohl in der PCU als auch in der NPCU-Gruppe deutliche Expressions-Steigerungen von diesem Marker zeigen. iNOS diente uns auch als „Qualitäts-Kontrolle“, um den Biopsie-Bereich im Colon als entzündeten Bereich zu verifizieren. Bei zwei Patienten gab es diesbezüglich Probleme, möglicherweise wurde bei beiden eine nicht-entzündete Stelle biopsiert. Dies weist auf die Bedeutung eines exakt-definierten Biopsie-Entnahme-Orts hin.

Eine signifikante mRNA-Expressions-Suppression bestand in der PCU-Gruppe für alle drei untersuchten Gallensäuretransporter, während in der NPCU-Gruppe nur die OST $\alpha$ -mRNA-Expression supprimiert war. Keiner der untersuchten Transporter hatte in der Remissions-Phase signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus kann man schließen, dass es während einer akuten Darm-Entzündung bei CU-Patienten zur Gallensäuretransporter-Expression-Suppression kommt. Während der Remissionphase ist dieser Prozess reversibel, da sich die Werte wieder normalisieren. Somit könnte es zu erhöhten intrazellulären Gallensäurenkonzentration kommen. Dieser Prozess könnte in Folge zu erhöhter Apoptose der Darmzellen führen und somit eine Rolle in der CU-Pathogenese im Sinne einer erleichterten Entzündungsausbreitung haben. Die Ursache dafür könnte eine negative Wirkung von Zytokinen auf die Expression von Gallensäuretransportern im Kolon sein. Falls diese Hypothese richtig ist, könnte durch medikamentöse Steigerung der Expression von Gallensäuretransporter einen positiven Einfluss auf den Verlauf der CU erzielen.

Die Rolle des Detoxifikationsenzym CYP3A4 kann in unserer Studie nur schwer beurteilt werden, da es aufgrund großer Schwankungen in keiner Gruppe zu signifikanten Suppressionen kam. Interessant ist, dass nach Ausschluss des mit Remicade<sup>®</sup> behandelten Patienten signifikante mRNA-Suppressionen in der PCU-Gruppe zu beobachten waren. Dies könnte ein indirekter Hinweis sein, dass mucosale Zytokine – die durch Infliximab vermindert produziert werden – die Suppressionen induzieren. TNF $\alpha$ -Antikörper könnten einen Einfluss auf die Gallensäure-Transporter-mRNA-Expressionen haben.

In Zukunft wäre es von Interesse, intraindividuelle Unterschiede der Gallensäuretransporter-Expressionen zwischen einzelnen Kolonabschnitten bei Patienten mit linksseitiger Colitis und Pancolitis zu untersuchen. Zudem könnte man bei größeren Patientenzahlen Medikamentenauswirkungen auf die Zytokin- und Gallensäuretransporter-Expressionen untersuchen.

Diese Studie zeigt, dass es während eines akuten CU-Schubs zur mRNA-Expressionsänderungen der Gallentransporter im Darm kommt. Unsere Daten

müssen zukünftig anhand größerer, homogener Patientengruppen bestätigt werden. Gallensäuren und deren Stoffwechsel könnten für die Pathogenese aber auch als therapeutisches Ziel bei CED von Interesse sein.

## 5) Literaturverzeichnis

1. Rogler, G. and T. Andus, *Cytokines in inflammatory bowel disease*. World J Surg, 1998. **22**(4): p. 382-9.
2. Bresci, G., et al., *Evaluation of clinical patterns in ulcerative colitis: a long-term follow-up*. Int J Clin Pharmacol Res, 1997. **17**(1): p. 17-22.
3. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
4. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 495-521.
5. Orchard, T.R., et al., *Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal*. Scand J Immunol, 2000. **51**(1): p. 10-7.
6. Tysk, C., et al., *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): p. 990-6.
7. Duerr, R.H., *Genetics of inflammatory bowel disease*. Inflamm. Bowel Dis., 1996. **2**(1): p. 48-60.
8. Satsangi, J., et al., *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): p. 199-202.
9. Curran, M.E., et al., *Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16*. Gastroenterology, 1998. **115**(5): p. 1066-71.
10. Duerr, R.H., et al., *Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12*. Am J Hum Genet, 1998. **63**(1): p. 95-100.
11. Hampe, J., et al., *Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p*. Am J Hum Genet, 1999. **65**(6): p. 1647-55.
12. Rioux, J.D., et al., *Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci*. Am J Hum Genet, 2000. **66**(6): p. 1863-70.
13. Cho, J.H., et al., *Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(9): p. 1425-32.
14. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. Gastroenterology, 1998. **115**(1): p. 182-205.
15. Bu, P., et al., *Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system*. J Immunol, 2001. **166**(10): p. 6399-403.
16. Boirivant, M., et al., *Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis*. Gastroenterology, 1999. **116**(3): p. 557-65.
17. Ina, K., et al., *Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 1081-90.

18. Rothfuss, K.S., E.F. Stange, and K.R. Herrlinger, *Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(30): p. 4819-31.
19. Vogt, W., *Toxic megacolon--the position of the internist*. Praxis (Bern 1994), 2006. **95**(44): p. 1722-6.
20. Rutter, M.D., et al., *Most dysplasia in ulcerative colitis is visible at colonoscopy*. Gastrointest Endosc, 2004. **60**(3): p. 334-9.
21. Eaden, J.A., K.R. Abrams, and J.F. Mayberry, *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis*. Gut, 2001. **48**(4): p. 526-35.
22. Itzkowitz, S.H. and D.H. Present, *Consensus conference: Colorectal cancer screening and surveillance in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(3): p. 314-21.
23. Kornbluth, A. and D.B. Sachar, *Ulcerative colitis practice guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee*. Am J Gastroenterol, 2004. **99**(7): p. 1371-85.
24. Winawer, S., et al., *Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence*. Gastroenterology, 2003. **124**(2): p. 544-60.
25. Cima, R.R. and J.H. Pemberton, *Medical and surgical management of chronic ulcerative colitis*. Arch Surg, 2005. **140**(3): p. 300-10.
26. Doherty, G.A. and A.S. Cheifetz, *Management of acute severe ulcerative colitis*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **3**(4): p. 395-405.
27. Leite, S., et al., *[Azathioprine in inflammatory bowel disease]*. Acta Med Port, 2009. **22**(1): p. 33-40.
28. Braegger, C.P., et al., *Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation*. Lancet, 1992. **339**(8785): p. 89-91.
29. Murch, S.H., et al., *Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease*. Gut, 1993. **34**(12): p. 1705-9.
30. Russell, D.W., *The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 137-74.
31. Martinez-Augustin, O. and F. Sanchez de Medina, *Intestinal bile acid physiology and pathophysiology*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5630-40.
32. Ridlon, J.M., D.J. Kang, and P.B. Hylemon, *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. J Lipid Res, 2006. **47**(2): p. 241-59.
33. Hofmann, A.F., *The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease*. Arch Intern Med, 1999. **159**(22): p. 2647-58.
34. Schiff, E.R., N.C. Small, and J.M. Dietschy, *Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat*. J Clin Invest, 1972. **51**(6): p. 1351-62.
35. Trauner, M. and J.L. Boyer, *Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation*. Physiol Rev, 2003. **83**(2): p. 633-71.
36. Shneider, B.L., *Intestinal bile acid transport: biology, physiology, and pathophysiology*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2001. **32**(4): p. 407-17.
37. Meier, P.J. and B. Stieger, *Bile salt transporters*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 635-61.

38. Rao, A., et al., *The organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is essential for intestinal bile acid transport and homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(10): p. 3891-6.
39. Eloranta, J.J. and G.A. Kullak-Ublick, *Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism*. Arch Biochem Biophys, 2005. **433**(2): p. 397-412.
40. Janvilisri, T., et al., *Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2)*. Biochem J, 2005. **385**(Pt 2): p. 419-26.
41. Dietrich, C.G., A. Geier, and R.P. Oude Elferink, *ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut*. Gut, 2003. **52**(12): p. 1788-95.
42. Langmann, T., et al., *Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 26-40.
43. Roediger, W.E. and W. Babidge, *Human colonocyte detoxification*. Gut, 1997. **41**(6): p. 731-4.
44. Overbergh, L., et al., *The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression*. J Biomol Tech, 2003. **14**(1): p. 33-43.
45. Morrison, T.B., J.J. Weis, and C.T. Wittwer, *Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification*. Biotechniques, 1998. **24**(6): p. 954-8, 960, 962.

Abbildung 1: Enterohepatischer Kreislauf

Modifiziert nach Ref 35

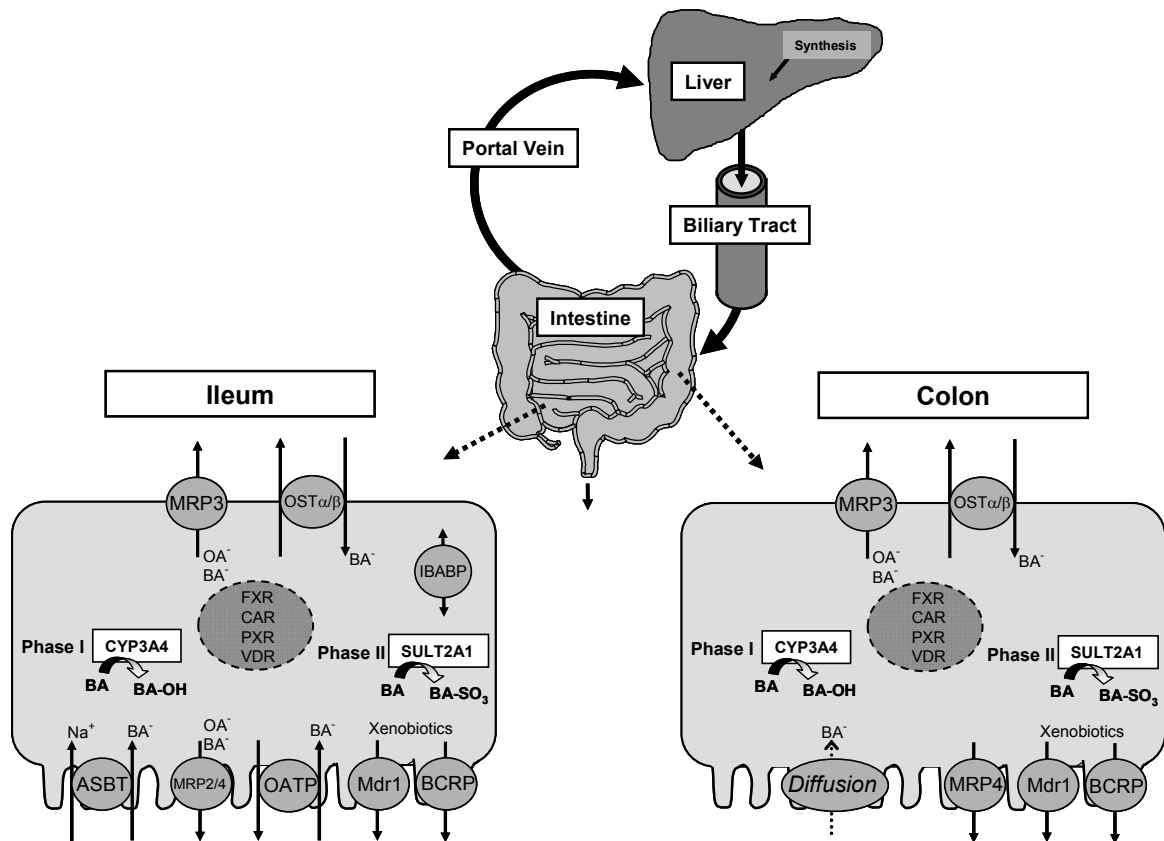


Tabelle 1: Ein- und Ausschlusskriterien

<b>Einschlusskriterien:</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Alter 18-75 Jahren</li><li>2. Body mass index 18-30 kg/m<sup>2</sup></li><li>3. Unterschriebener Einwilligungsbogen</li><li>4. Koloskopie-Tauglichkeit</li><li>5. Screening-Koloskopie oder Colon irritabile</li><li>6. Koloskopische + histologische Diagnose CU (außer Kontrollpatienten)</li></ol>	<b>Ausschlusskriterien:</b> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Bestehen einer Kontraindikation für Koloskopie</li><li>2. Bestehen einer schweren Grunderkrankung</li><li>3. Schwangerschaft oder stillende Frauen</li><li>4. Fehlen des unterschriebenen Einwilligungsbogen</li></ol>
--	---

Tabelle 2: Patienten

		n=
<b>Kontrolle</b>		<b>9</b>
<b>Colitis ulcerosa n=14</b>	<b>PCU</b>	<b>5</b>
	<b>NPCU</b>	<b>4</b>
	<b>Remission</b>	<b>5</b>
<b>Morbus Crohn n=31</b>	<b>Ileitis</b>	<b>4</b>
	<b>Ileitis + colitis</b>	<b>10</b>
	<b>Colitis</b>	<b>10</b>
	<b>Remission</b>	<b>7</b>
<b>Andere*</b>		<b>83</b>
<b>Gesamt</b>		<b><u>137</u></b>

\*Andere: Alter unpassend, unklare Diagnose, fehlende Daten (Labor, Histologie usw.)

Tabelle 3: Patientencharakterisierung

	<b>Kontrolle n=9</b>	<b>PCU n=5</b>	<b>NPCU n=4</b>	<b>Remission n=5</b>
<b>1. Geschlecht</b>				
Männlich (%)	4 (44)	5 (100)	2 (50)	4 (80)
Weiblich (%)	5 (56)	-	2 (50)	1 (20)
<b>2. Alter</b>				
Alter bei Biopsie (Mw±Sa)	38 ± 9	37 ± 19	43 ± 20	50 ± 16
Alter bei Erstdiagnose (Mw±Sa)	-	28 ± 18	33 ± 18	37 ± 20
<b>3. Koloskopie-Indikationen</b>				
Kontrollkoloskopie (%)	1 (11)	2 (40)	2 (50)	5 (100)
Verdacht auf CU (%)	2 (22)	-	1 (25)	-
CU-Schub (%)	-	3 (60)	1 (25)	-
Stuhlunregelmäßigkeiten (%)	3 (33)	-	-	-
Rez. abdominale Beschwerden (%)	2 (22)	-	-	-
Anämie (%)	1 (11)	-	-	-
<b>4. Symptome</b>				
Beschwerdefrei (%)	2 (22)	2 (40)	3 (75)	5 (100)
Stuhlunregelmäßigkeiten (%)	3 (33)	3 (60)	1 (25)	-
Bauchschmerzen (%)	6 (67)	-	1 (11)	-
Anämie (%)	1 (11)	-	-	-
Fieber	1 (11)	-	1 (11)	-
Back wash Ileitis (%)	-	1 (20)	-	-
<b>5. Begleiterkrankungen</b>				
Gastritis	1 (11)	-	-	-
Cholezystolithiasis (%)	1 (11)	-	-	-
PSC (%)	-	-	1 (25)	-
Osteoporose (%)	-	-	1 (25)	-
Polypen (%)	-	1 (20)	-	-
Eisenmangel (%)	-	3 (60)	-	-
Hypochrome mikrozyt. Anämie (%)	1 (11)	-	-	-
Hämorrhoiden (%)	1 (11)	-	-	-
Fruktoseintoleranz (%)	1 (11)	-	-	-
<b>6. Anamnese</b>				
St.p. Polypektomie (%)	-	1 (20)	-	1 (20)
St.p. Salyzilatherapie (%)	-	1 (20)	-	-
St.p. Steroidtherapie (%)	-	1 (20)	-	-
St.p. ColonadenomOP (%)	-	-	-	1 (20)
St.p. Immunsup. mit Azathioprin (%)	-	1 (20)	-	1 (20)

Tabelle 4: Material und Methoden

<p><b>1. RNA-Checkgel (Agarosegelelektrophorese)</b></p>	<p><b>&gt; Probenvorbereitung für RNA-Gel:</b></p> <p>10 µl Probenpuffer  <u>2 µl Gelladepuffer</u>  + 1500 ng RNA</p> <p><b>&gt; Durchführung:</b></p> <p>1g Agarose Saecem ME  + <u>70 ml Aqua dest</u>  Aufkochen lassen</p> <p>+ Aqua dest ad 82 ml  + 8 ml Formaldehyd  + <u>10 ml 10x MOPS</u>  Gut mischen und Gel gießen</p>
<p><b>2. cDNA-Synthese;</b></p>	<p><b>&gt; Master Mix</b></p> <p>+ 4 µl 5x Buffer (Invitrogen, Österreich)  + 2 µl 0,1M DTT (Invitrogen, Österreich)  + 0,5 µl Super Script (reverse Transkriptase) (Invitrogen, Österreich)  + 0,3 µl dNTP Mix (Nukleotide) (Applied Biosystems, GB)  + 0,5 µl RNAase-Inhibitor (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)  + 2,7 µl Aqua dest</p> <p><b>&gt; Thermo Cycler-Programm</b></p> <p>65°C            5 min  25°C            10 min  <b>42°C            90 min - bei diesem Schritt  den MasterMix dazugeben</b>  70°C            15 min</p> <p>cDNA 1:20 mit Aqua dest. verdünnen und in die PCR einsetzen</p>
<p><b>3. Realtime PCR:</b></p>	<p><b>&gt; PCR-Ansatz:</b></p> <p>3,5 µl verdünnte cDNA  + 5,6 µl Aqua dest  + 0,7 µl forward Primer (MGW Biotech AG, Deutschland)  + 0,7 µl reverse Primer (MGW Biotech AG, Deutschland)  + 10,5 µl Master Mix (Applied Biosystems, USA)</p>

Tabelle 5: Medikation vor Koloskopie

		<b>Kontrolle n=9</b>	<b>PCU n=5</b>	<b>NPCU n=4</b>	<b>Remission n=5</b>
<b>Aprednislon<sup>®</sup></b> <b>=Prednisolon</b>	(%)	-	2 (40)	2 (50)	-
<b>Imurek<sup>®</sup></b> <b>=Azathioprine</b>	(%)	-	-	-	2 (40)
<b>Claversal<sup>®</sup> / Mesagran<sup>®</sup></b> <b>=Mesalazin</b>	(%)	-	2 (40)	1 (25)	1 (20)
<b>Salofalk<sup>®</sup></b> <b>=Salazopyrin</b>	(%)	-	1 (20)	-	1 (20)
<b>Remicade<sup>®</sup></b> <b>=Infliximab</b>	(%)	-	1 (20)	-	-
<b>Ursofalk<sup>®</sup></b> <b>=Ursodeoxycholsäure</b>	(%)	-	-	1 (25)	-
<b>Cal-D-Vita<sup>®</sup></b> <b>=Calcium-Karbonat</b>	(%)	-	-	1 (25)	-

Tabelle 6a: CRP-Laborwerte

	<b>Kontrolle</b> n=6	<b>PCU</b> n=4	<b>NPCU</b> n=3	<b>Remission</b> n=2
CRP (Mw±Sta)	2 ± 2	14 ± 10*	21 ± 31	2 ± 1

\* p&lt;0.05

Tabelle 6b: Leukozyten-Werte

	<b>Kontrolle</b> n=8	<b>PCU</b> n=4	<b>NPCU</b> n=3	<b>Remission</b> n=3
Leukozytenzahl (Mw±Sta)	6598±1892	10503±2998*	9400±3865	7267±2820

\* PCU vs. Kontrolle p&lt;0.05

Tabelle 7: Expressionsmuster

	<b>Kontrolle</b>	<b>PCU</b>	<b>NPCU</b>	<b>Remission</b>
Werte in Prozent				
<b>GAPDH</b>	100 ± 33	135 ± 70	92 ± 57	76 ± 31
<b>iNOS</b>	100 ± 52	3541 ± 4263*	2692 ± 4261	53 ± 15*
<b>MRP3</b>	100 ± 36	50 ± 10*	70 ± 37	94 ± 34
<b>OST<math>\alpha</math></b>	100 ± 48	20 ± 31*	24 ± 19*	50 ± 34
<b>OST<math>\beta</math></b>	100 ± 62	29 ± 16*	80 ± 33	73 ± 18
<b>CYP3A4</b>	100 ± 127	152 ± 309	70 ± 65	42 ± 28

\*Signifikante Veränderung

Patientenzahl in einzelnen Patientengruppen variiert (siehe unter 3.4.2. und 3.4.3.)

## **Anhang 1 –Projektplan**

### ***Zeit und Projektmanagement***

#### ***Zeitlicher Ablauf (voraussichtlicher Beginn und Ende, Meilensteine)***

17. April 2007 Erste telephonische Kontaktaufnahme mit Univ. Doz. Dr. Peter Fickert.
23. April 2007 Vorstellungsgespräch bei Univ. Doz. Dr. Peter Fickert. Regelmäßige Biopsiensammlung während Koloskopien.
25. April 2007 Treffen mit Univ. Doz. Dr. Peter Fickert im Zentrum für Medizinische Forschung und Vorstellung bei den Mitarbeitern.
- 2007 und 2008 Regelmäßige Teilnahmen an Koloskopien an der Medizinischen Universitätsklinik für Innere Medizin mit Sammlung von Biopsien. Parallel dazu erfolgte die Erfassung biometrischer Daten (Anlegen einer Excel-Datei).
2. März 2009 Bekanntgabe der Diplomarbeit im Studienrektorat. Festlegung des definitiven Titels.
30. Sept. 2009 Abgabe der Diplomarbeit in der Studienabteilung

#### ***Zustimmung durch den Leiter der Organisationseinheit, falls Kosten anfallen***

Es erfolgte die Zustimmung von Univ. Prof. Dr. Michael Trauner

## Anhang 2 - Datenblatt zur Studie

Datum der Koloskopie

Interne Nummer:

Körpergewicht

Körpergröße

BMI

**Indikation zur Koloskopie:**

**Andere Erkrankungen:**

**Medikation:**

**Operationen:**

**Bei CED: Befallsmuster:**

term Ileum

ja/nein

Colon ascendens

ja/nein

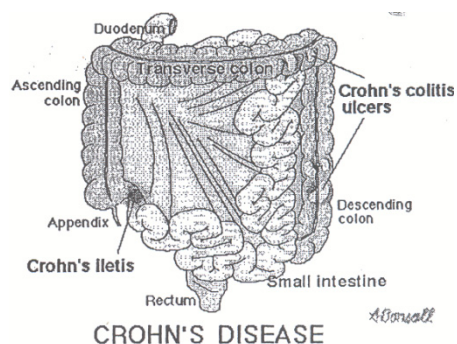
Colon descendens

ja/nein

Rektum

ja/nein

**Biopsien: Wo entnommen? Wieviel?**



**Diagnose nach Koloskopie:**

## Anhang 3 - Patienteninformation

### ***Patienteninformation zur Teilnahme an der klinischen Studie***

#### **Charakterisierung der molekularen Regulation des intestinalen Gallensäuretransportes und -metabolismus im Dün- und Dickdarm bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Sehr geehrte Teilnehmerin, sehr geehrter Teilnehmer!

Wir laden Sie ein an der oben genannten klinischen Studie teilzunehmen. Die Aufklärung darüber erfolgt in einem ausführlichen ärztlichen Gespräch.

**Die Teilnahme an einer klinischen Studie ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen durch Sie beendet werden, ohne dass Ihnen hierdurch Nachteile in Ihrer medizinischen Betreuung entstehen.**

Klinische Studien sind notwendig, um verlässliche neue medizinische Forschungsergebnisse zu gewinnen. Unverzichtbare Voraussetzung für die Durchführung einer klinischen Studie ist jedoch, dass Sie Ihr Einverständnis zur Teilnahme an dieser klinischen Studie schriftlich erklären. Bitte lesen Sie den folgenden Text als Ergänzung zum Informationsgespräch mit Ihrem Arzt sorgfältig durch und zögern Sie nicht Fragen zu stellen. Bitte unterschreiben Sie die Einwilligungserklärung nur

- wenn Sie Art und Ablauf der klinischen Studie vollständig verstanden haben,
- wenn Sie bereit sind, der Teilnahme zuzustimmen und
- wenn Sie sich über Ihre Rechte als Teilnehmer an dieser klinischen Studie im Klaren sind.

Zu dieser klinischen Studie, sowie zur Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurde von der zuständigen Ethikkommission eine befürwortende Stellungnahme abgegeben.

## 1. Was ist der Zweck der klinischen Studie?

Zweck dieser Studie ist es neue Kenntnisse über den Gallensäuren- Stoffwechsel im Darm zu erhalten. Dazu werden Darmbiopsien von PatientInnen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa auf die Menge von Gallensäuren- Transportsystemen im Gewebe mittels spezieller Labormethoden (Polymerasenkettenreaktion, Western Blotting) auf Ribonukleinsäure- und Eiweiß-Ebene untersucht und mit gesunden KontrollpatientInnen verglichen. Mit Hilfe dieser Studie soll geklärt werden, warum eine chronische Darmentzündung zur verminderten Wiederaufnahme von Gallensäuren vom Darm ins Blut (Gallensäuren-Malabsorption) und somit eventuell zur verstärkten Ausscheidung über den Stuhl führt. Wir hoffen, durch die erhaltenen Informationen neue Strategien in der Behandlung von chronischen Darmerkrankungen etablieren zu können, da Gallensäuren den Durchfall verschlimmern können und die Entstehung von Dickdarmkrebs (welcher bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gehäuft auftritt) begünstigen können.

### Hintergrundwissen:

Der Einfluss von chronischen Darmentzündungen auf den Gallensäuren-Stoffwechsel ist noch weitgehend ungeklärt. Die Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterin gebildet und über die Gallenwege in den Darm ausgeschieden, wo sie für die Verdauung und Aufnahme von Fetten aus der Nahrung von Bedeutung sind. Der größte Teil wird im letzten Abschnitt des Dünndarms (Krummdarm) wieder „aktiv“ durch spezielle Transport-Systeme aufgenommen und gelangt über die Pfortader oder über die Lymphgefäße wieder in die Leber zurück. Ein kleiner Teil gelangt in den Dickdarm und wird dort passiv wieder aufgenommen, nur ganz geringe Mengen an Gallensäuren werden über den Stuhl ausgeschieden. Somit „kreisen“ die Gallensäuren jeden Tag oftmals zwischen Leber und Darm, dafür sind zahlreiche Transportproteine in Leber und Darm notwendig. Bei Vorliegen einer chronischen Entzündung im Darm (z.B. Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn) kann es zu Störungen in der Funktion oder in der Regulation dieser Transportproteine kommen und somit dieser Kreislauf teilweise unterbrochen werden. Die Folge ist einerseits eine gesteigerte Konzentration von Gallensäuren in der Dickdarmzelle und andererseits eine gesteigerte Ausscheidung über den Stuhl. Dadurch kann der

Entzündungsprozess verstärkt werden. Es könnten charakteristische Symptome der chronisch-entzündlichen Darmentzündungen (CED) und auch Zusammenhänge der Entwicklung von Dickdarmkrebs bei CED erklärt werden. Die zellulären und molekularen Mechanismen die diesen Veränderungen zugrunde liegen sind jedoch noch unklar und sind Gegenstand dieser Studie.

## **2. Wie läuft die klinische Studie ab?**

Diese klinische Studie wird ausschließlich an der Medizinischen Universitätsklinik Graz durchgeführt und es werden insgesamt ungefähr 32 Personen daran teilnehmen. Im Rahmen dieser Studie werden zusätzliche 6 Schleimhaut-Proben (Biopsien) im Rahmen der geplanten Dickdarmspiegelung für die geplanten wissenschaftlichen Labor- Untersuchungen entnommen.

Diese 6 Proben aus der Schleimhaut der wichtigsten Teile des Dickdarms und des Krummdarms werden sofort eingefroren und daraufhin auf Menge und Aktivität der oben erwähnten Transportproteine analysiert. Alle Proben werden durch Kodierung anonymisiert, es ist nur dem Projektverantwortlichen (Univ. Prof. Dr. Michael Trauner) möglich die Ergebnisse zu personenbezogenen Daten zu verknüpfen. Die Auswertung der gewonnen Ergebnisse dient rein wissenschaftlichem Interesse. Der Prüfarzt wird Sie auf Wunsch über die Gesamtergebnisse der Studie informieren, individuelle Ergebnisse der molekularbiologischen Analysen werden nicht mitgeteilt.

## **3. Worin liegt der Nutzen einer Teilnahme an der Klinischen Studie?**

Es ist nicht zu erwarten, dass Sie aus Ihrer Teilnahme an dieser klinischen Studie gesundheitlichen Nutzen ziehen werden. Durch den gewonnen Erkenntnisgewinn für die medizinische Wissenschaft jedoch könnte es zu neuen Behandlungsmöglichkeiten kommen.

## **4. Gibt es Risiken, Beschwerden und Begleiterscheinungen?**

Prinzipiell entsteht durch die studienbezogenen Maßnahmen kein zusätzliches

Risiko. Die möglichen Komplikationen einer Koloskopie mit Biopsie-Entnahmen entnehmen Sie bitte dem „Info-Teil“ des Aufklärungs-/Einwilligungsbogen, den Sie ebenfalls erhalten haben.

## **5. Wann wird die klinische Studie vorzeitig beendet?**

Sie können jederzeit auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Teilnahmebereitschaft widerrufen und aus der klinischen Studie ausscheiden ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre weitere medizinische Betreuung entstehen. Bei einem Widerruf werden die Daten für keine anderen Zwecke verwendet.

## **6. In welcher Weise werden die im Rahmen dieser klinischen Studie gesammelten Daten verwendet?**

Nur der Prüfer und dessen Mitarbeiter haben Zugang zu den vertraulichen Daten, in denen Sie namentlich genannt werden. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht.

Die Weitergabe der Daten erfolgt ausschließlich zu statistischen Zwecken und Sie werden ausnahmslos darin nicht namentlich genannt. Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten dieser klinischen Studie werden Sie nicht namentlich genannt.

## **7. Entstehen für die Teilnehmer Kosten? Gibt es einen Kostenersatz oder eine Vergütung?**

Durch Ihre Teilnahme an dieser klinischen Studie entstehen für Sie keine zusätzlichen Kosten, ein Kostenersatz oder eine Vergütung ist nicht vorgesehen.

## **8. Möglichkeit zur Diskussion weiterer Fragen**

Für weitere Fragen im Zusammenhang mit dieser klinischen Studie stehen Ihnen Ihr Prüfarzt und seine Mitarbeiter gern zur Verfügung (Namen und Telefonnummern siehe Punkt 9, Einwilligungserklärung). Auch Fragen, die Ihre Rechte als Patient und Teilnehmer an dieser klinischen Studie betreffen, werden Ihnen gerne beantwortet.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Goran Šućur  
Geboren am: 11. August 1980 in Gradiška, Bosnien und Herzegowina  
Familienstand: ledig

### Ausbildung

Seit 10/2003 Medizinstudium an der Medizinische Universität Graz  
10/2002-6/2003 Deutschkurs am Vorstudienlehrgang der Karl-Franzens-Universität Graz  
10/1999-6/2002 Medizinische Fakultät der Universität Banja Luka  
9/1995-6/1999 Gymnasium Gradiška, Gradiška  
Reifeprüfung mit Auszeichnung bestanden

### Praktische Erfahrungen:

09/2005 Pflichtfamulatur an der Klinischen Abteilung für Herzchirurgie im Landeskrankenhaus (LKH) Graz (2 Wochen)  
07/2006 Pflichtfamulatur an der Allgemeinen Inneren und Pulmonologischen Abteilung LKH Graz (2 Wochen)  
09/2006 Pflichtfamulatur im Orthopädischen Krankenhaus „Valdoltra“ Ankaran, Slowenien (3 Wochen)  
09/2007 Pflichtfamulatur im Orthopädischen Krankenhaus „Valdoltra“ Ankaran, Slowenien (2 Wochen)  
03/2008 Pflichtfamulatur an der Medizinischen Abteilung des LKH Bruck an der Mur (2 Wochen)  
07/2008 Pflichtfamulatur an der Universitätsklinik für Unfallchirurgie des LKH Graz (2 Wochen)  
08/2008 Pflichtfamulatur an der Universitätsklinik für Neurologie des LKH Graz (3 Wochen)

### Persönliche Interessen

Sport Karate, Schifahren, Jogging