

**Diplomarbeit**

**Untersuchung des Expressionsmusters von  
Gallensäuretransportern im terminalen Ileum bei  
Patienten mit Morbus Crohn**

eingereicht von

**Slaviša Dujaković**

Mat.Nr.: 0214412

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Zahnheilkunde**

**(Dr. med. dent.)**

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 14.3.2010

Slaviša Dujaković

## **Eidesstattliche Erklärung**

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

---

Slaviša Dujaković

Graz, am 14.3.2010

## **Vorwort**

Morbus Crohn ist eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung mit Entzündung insbesondere in jenem Darmabschnitt, in dem physiologisch ein Großteil der intestinalen Gallensäurenresorption stattfindet. Ziel dieser Arbeit war es, mRNA-Expressionsveränderungen von intestinalen Gallensäuretransportproteinen bei Morbus Crohn Patienten mit Hilfe von Dünndarm-Biopsien zu untersuchen. Wir verfolgten die Hypothese, dass – vergleichbar der Situation in der Leber während einer Akut-Phase-Reaktion – durch Entzündungsmediatoren die mRNA-Expressionen von spezifischen Gallensäuren-Transportern vermindert werden. Unsere Ergebnisse zeigten Expressionsminderungen bei zwei Transportern und bei einem Detoxifikationsenzym, die übrigen untersuchten Transporter für Gallensäuren waren unverändert. Aus dieser Studie schließen wir, dass bei Morbus Crohn Patienten der intestinale Gallensäuretransport zwar verändert ist, jedoch in der Quantität kaum beeinflusst wird.

## **Danksagungen**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Michael Trauner und seinem gesamten Team bedanken. Hervorheben möchte ich Doz. Dr. Peter Fickert, Dr. Jörg Jahnel, Dipl.med.tech. Judith Gumhold, Dipl.med.tech. Dagmar Silbert, Mag. Antonia Griesbacher und Dr. Goran Sućur.

Mein Dank geht insbesondere auch an meine Eltern, meine Schwester und an meine Freundin für das Vertrauen, die Geduld und die Unterstützung, die sie mir während dieser Arbeit gegeben haben.

Ich möchte mich auch bei all jenen bedanken, die bei dieser Dankessagung nicht namentlich genannt worden sind, jedoch zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen haben.

## Zusammenfassung

Um den intestinalen transmuralen Gallensäure-Transport während einer Ileitis bei Morbus Crohn (MC) Patienten zu untersuchen, wurden mRNA Expressionsmuster von Gallensäure-Transportern und -kernrezeptoren aus Ileumbiopsien von MC Patienten in unterschiedlichen Aktivitätsstadien (aktive Ileitis n=14; Remission n=7) mit darmgesunden Kontrollpatienten (n=9) verglichen. Im akuten Schub zeigte sich die mRNA-Expression sowohl des apikalen Gallensäure-Aufnahmetransporter ASBT (Apical sodium dependent bile acid transporter; 36%;  $p<0.05$ ) als auch des apikalen Gallensäure-Abgabetransporter BCRP (Breast cancer resistance protein; 57%;  $p<0.05$ ) signifikant vermindert. Während der Remission war die Expressionsminderung beim ASBT (53%;  $p<0.05$ ) - aber nicht beim BCRP (67%) - weiterbestehend. Unverändert zeigte sich auch der zweite apikale Efflux-Transporter MDR1 (Multidrug resistance gene 1; 76 % im Schub bzw. 93% in der Remission), wie auch das intrazelluläre Gallensäure-Bindungsprotein I-BABP (Ileal bile acid binding protein; 73% bzw. 90%). Die Expressionen der basalen Abgabetransporter OST $\alpha$  (Organic solute transporter alpha; 118% bzw. 96%), OST $\beta$  (Organic solute transporter beta; 84 bzw. 72%) und MRP3 (Multidrug resistance protein 3; 132% bzw. 119%) waren unverändert. Die Expression des Detoxifikationsenzym SULT2A1 (Sulfotransferase 2A1) war während des akuten Schubs signifikant vermindert (31%,  $p<0.05$ ). Die durch Gallensäuren induzierbaren Kernrezeptoren FXR (Farnesoid X receptor; 76% bzw. 64%), SHP (Small heterodimer partner; 105% bzw. 104%), PXR (Pregnane X receptor; 88% bzw. 79%) und VDR (Vitamin D receptor; 74% bzw. 90%) zeigten wie der Entzündungsmediator TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha; 127% bzw. 261%) keine signifikanten Änderungen. Die Expression der im Sinne einer Positivkontrolle bei Entzündung induzierten verwendeten iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase), war sowohl im akuten Schub (27-fach;  $p<0.05$ ), als auch in der Remission (4-fach;  $p<0.05$ ) signifikant erhöht. Zusammenfassend werden im MC-Schub einzelne Gallensäuretransporter-Expressionen reduziert.

## Abstract

In order to investigate mRNA expression changes of intestinal bile acid transporters during ileitis in Crohn's disease (CD), we compared the mRNA expression pattern of bile acid transporters and nuclear receptors in ileal biopsies from CD patients in different stages of disease activity (active ileitis n=14, remission n=7) and compared these to healthy control subjects (n=9). We found significant decreased mRNA levels of the apical sodium dependent bile acid import transporter (ASBT; 36%,  $p<0.05$ ), and of the apical bile acid export transporter BCRP (Breast cancer resistance protein; 57%,  $p<0.05$ ) in acute CD. During remission of CD, the mRNA expression levels of ASBT - but not of BCRP - were still reduced (53%,  $p<0.05$ ). No significant changes were observed in regard to the second apical efflux transporter MDR1 (Multidrug resistance gene 1) or the ileal bile acid binding protein (I-BABP). In addition, the basal export-pumps OST $\alpha$  (Organic solute transporter alpha), OST $\beta$  and MRP3 (Multidrug resistance protein 3) were also unchanged. Significant reduced mRNA expression showed the detoxification enzyme SULT2A1 (Sulfotransferase 2A1; 31%,  $p<0.05$ ). Nuclear receptors for bile acids like FXR (Farnesoid X receptor), PXR (Pregnane X receptor) or VDR (Vitamin D receptor) were unchanged. The proinflammatory TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) mRNA expression was induced without reaching statistical significance. Finally, iNOS (Inducible nitric oxide synthase, used as positive control for inflammatory induced gene expression) was significantly induced in acute MC (27 times,  $p<0.05$ ) as well as in remission (4 times,  $p<0.05$ ). In summary, we were able to detect mRNA expression changes of several bile acid transporters in acute CD.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	2
Vorwort .....	3
Danksagungen .....	4
Zusammenfassung .....	5
Abstract .....	6
Inhaltsverzeichnis .....	7
Glossar und Abkürzungen .....	9
Tabellenverzeichnis .....	11
1 Einleitung: Grundlagen .....	12
1.1 Gallensäuretransporter .....	12
1.1.1 „Enterohepatischer Kreislauf“ der Gallensäuren .....	12
1.1.2 Gallensäuren-Transport im terminalen Ileum .....	12
1.2 Morbus Crohn .....	14
1.2.1 Ätiologie .....	14
1.2.2 Pathophysiologie .....	14
1.2.3 Klinisches Bild .....	15
1.2.4 Diagnose .....	15
1.2.4.1 CDAI .....	16
1.2.5 Therapie .....	16
1.2.5.1 Glukokortikoide .....	16
1.2.5.2 Aminosalizylate .....	16
1.2.5.3 Immunsuppressiva .....	17
1.2.5.4 Biologika .....	17
1.2.5.5 Chirurgie .....	18
2 Material und Methoden .....	19
2.1 Rekrutierung der Patienten .....	19
2.2 Biopsieentnahme .....	20
2.3 Datenblatt .....	20
2.4 Fall- und Kontrollgruppe .....	20
2.5 Auswertung der Proben mittels RT-PCR .....	21
2.5.1 RNA-Isolation .....	21
2.5.2 cDNA-Synthese .....	21
2.5.3 Realtime PCR .....	22
2.6 Statistische Ausarbeitung .....	23
3 Resultate .....	24
3.1 Patientencharakterisierung .....	24
3.1.1 Patientenzahl, Geschlecht und Alter .....	24
3.1.2 Indikationen und Symptome .....	24
3.1.3 Begleiterkrankungen .....	24
3.1.4 Anamnese: Medikation .....	25
3.1.5 Anamnese: Operationen .....	25
3.2 Expressionsmuster .....	25
3.2.1 Positiv-Kontrolle .....	25
3.2.2 Gallensäuretransporter .....	26
3.2.2.1 ASBT .....	26
3.2.2.2 MRP3 .....	26
3.2.2.3 OST $\alpha$ /OST $\beta$ .....	26

3.2.2.4	BCRP .....	26
3.2.2.5	MDR1 .....	26
3.2.2.6	I-BABP .....	27
3.2.2.7	FXR .....	27
3.2.2.8	SHP .....	27
3.2.2.9	PXR .....	27
3.2.2.10	VDR .....	27
3.2.2.11	SULT2A1 .....	27
3.2.2.12	TNF $\alpha$ .....	27
3.2.3	Laborwerte .....	28
4	Diskussion .....	29
Anhang 1	– Tabellen .....	32
Anhang 2	– Projektplan .....	40
Anhang 3	– Datenblatt zur Studie .....	41
Anhang 4	– Patienteninformation .....	42
Anhang 5	– Lebenslauf .....	46
Anhang 6	– Literaturverzeichnis .....	48

## Glossar und Abkürzungen

<b>5-ASA</b>	5- aminosalicylic acid
<b>A. dest.</b>	Aqua destillata
<b>ASBT</b>	Apical sodium dependent bile acid transporter
<b>BCRP</b>	Breast cancer resistance protein
<b>CDAI</b>	Crohn´s disease activity index
<b>cDNA</b>	Complementary deoxyribonucleic acid
<b>CED</b>	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CU</b>	Colitis ulcerosa
<b>CYP7A1</b>	Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>FABP</b>	Fatty acid-binding protein
<b>FGF 19</b>	Fibroblast growth factor 19
<b>FXR</b>	Farnesoid X receptor
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
<b>I-BABP</b>	Ileal bile acid binding protein
<b>IBAT</b>	Ileal bile acid transporter
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	Inductible nitric oxide synthase
<b>I.v.</b>	Intravenous
<b>LCA</b>	Lithocholic acid
<b>MC</b>	Morbus Crohn
<b>mRNA</b>	Messenger RNA
<b>MRP3</b>	Multidrug resistance protein 3
<b>MDR1</b>	Multidrug resistance gen 1
<b>MTX</b>	Methotrexate

<b>NPCU</b>	Nicht-Pancolitis ulcerosa
<b>NSAR</b>	Nicht-steroidale Antirheumatika
<b>OATP</b>	Organic anion transporting polypeptide
<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>PXR</b>	Pregnane X receptor
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>RT-PCR</b>	Real-time polymerase chain reaction
<b>SHP</b>	Small heterodimer partner
<b>St.d.</b>	Standard deviation
<b>SULT2A1</b>	Sulfotransferase 2A1
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>VDR</b>	Vitamin D receptor
<b>ZMF</b>	Zentrum für medizinische Forschung

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	<b>Anzahl der Patienten</b>	Seite 32
Tabelle 2a	<b>Patientencharakterisierung Teil 1</b>	Seite 33
Tabelle 2b	<b>Patientencharakterisierung Teil 2</b>	Seite 34
Tabelle 3	<b>Medikation zum Zeitpunkt der Koloskopie</b>	Seite 35
Tabelle 4	<b>Labor: Serumdaten</b>	Seite 36
Tabelle 5	<b>mRNA Expressionsmuster von Gallensäure-Transportern/GAPDH</b>	Seite 37
Tabelle 6	<b>Ergänzung zu Material und Methoden</b>	Seite 38
Tabelle 7	<b>CDAI</b>	Seite 39

# 1 Einleitung: Grundlagen

## 1.1 Gallensäuretransporter

### 1.1.1 „Enterohepatischer Kreislauf“ der Gallensäuren

Gallensäuren werden in der Leber aus Cholesterol durch die Enzyme Cholesterol 7 $\alpha$ -Hydroxylase [CYP7A1] oder Oxysterol-7 $\alpha$ -Hydroxylase [CYP7B1] gebildet, gelangen über die Gallenwege ins Duodenum und werden größtenteils im terminalen Ileum reabsorbiert. Daher spricht man von einem „enterohepatischen Kreislauf“ der Gallensäuren [1]. Im Dünndarm sind die Gallensäuren z.B. für die Verdauung von Nahrungs-Fetten unabkömmlich. Ein kleiner Teil (5 bis 10%) wird nicht rückresorbiert, tritt ins Kolon über, wo durch Darmbakterien aus den primären Gallensäuren (Cholsäure und Chenodeoxycholsäure) sekundäre Gallensäuren (Cholsäure, Chenodeoxycholsäure, Desoxycholsäure und Lithocholsäure) entstehen, die schließlich über den Stuhl ausgeschieden werden.

### 1.1.2 Gallensäuren-Transport im terminalen Ileum

Entscheidend für den enterohepatischen Kreislauf der Gallensäuren sind spezielle Transportproteine, welche die zelluläre Aufnahme und Abgabe sowohl im Darm, als auch in der Leber ermöglichen. Im Ileum werden die konjugierten Gallensäuren aus dem Darmlumen in die Darmzelle größtenteils durch das an der apikalen Membran (entspricht der Darmlumen zugewandten Seite des Enterozyten) lokalisierte Transportsystem **ASBT/SLC10A2** (Apical sodium dependent bile acid transporter) aufgenommen, welches auch als IBAT (Ileal bile acid transporter) bezeichnet wird [2]. Nur die unkonjugierten Gallensäuren können (wie im Colon) passiv durch die Zellmembran diffundieren. Der basolaterale Gallensäureefflux ins portalvenöse Blut erfolgt im Enterozyten des terminalen Ileum einerseits (zu einem geringerer Anteil) durch **MRP3** (Multidrug resistance protein 3), andererseits durch den heterodimeren Transporter **OST $\alpha$ /OST $\beta$**  (Organic solute transporter) [3]. Der Transport innerhalb des Enterozyten wird durch **I-BABP** (Ileal bile acid binding protein) ermöglicht. Dieser lösliche Gallensäuretransporter gehört der FABP (Fatty acid-binding Protein) Familie an und seine noch nicht ins Detail verstandene Rolle im intrazellulären Gallensäuretransport ist im Darm auf das Ileum beschränkt [4, 5].

Nach Aufnahme der Gallensäuren in den Enterozyten können diese nicht nur weiter ins Blut abgegeben werden, sondern werden teilweise modifiziert und anschließend wieder zurück ins Darmlumen transportiert. **SULT2A1** (Sulfotransferase-2A1) ist ein Beispiel für ein Enzym, welches die Konjugation von Sulfaten an (vorwiegend sekundäre) Gallensäuren im Sinne einer Detoxifikation ermöglicht [6]. Vom Enterozyten zurück ins Darmlumen werden Gallensäuren durch das Protein **BCRP** (Breast cancer resistance protein) transportiert. Dessen Namensgebung stammt aus der onkologischen Forschung, da auch Chemotherapeutika mittels dieses Transporters im Falle von Resistenzen aus dem Enterozyten zurück ins Darmlumen exportiert werden können [7]. Auf ähnliche Weise wurde auch **MDR1** (Multidrug resistance gen 1) in der onkologischen Forschung entdeckt, welches für das P-Glykoprotein kodiert, das wiederum ein apikales Effluxsystem für Xenobitika und Gallensäuren ist [8, 9]. Interessanterweise zeigten MDR1 knockout Mäuse histologische Eigenschaften einer CED (Chronisch Entzündliche Darmerkrankung). Ein pathogenetischer Zusammenhang zwischen reduzierter MDR1 Expression (oder Aktivität) in der intestinalen Epithelzelle und Entstehung von CEDs könnte daher vorliegen [10, 11].

Über Bindung und Aktivierung von **FXR** (Farnesoid X receptor), der als zentraler Kernrezeptor für die Regulation der Gallensäuresynthese und des Gallensäuretransports dient, können Gallensäuren die Expression des intrazellulären Transporters I-BABP und der basolateralen Gallensäuretransportern OST $\alpha$ /OST $\beta$  induzieren und dadurch eine intestinale Resorption von Gallensäuren fördern. Zusätzlich führt die FXR-Aktivierung zur Expression von **FGF19** (Fibroblast growth factor 19), welcher über das Blut in die Leber gelangt und dort die CYP7A1 [12] Expression in den Hepatozyten hemmt. CYP7A1 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der klassischen Gallensäuresynthese [13]. Die Bindung von Gallensäuren an FXR induziert die Transkription von **SHP** (Small heterodimer partner), der zu einer Repression von CYP7A1 und anderer Gene führt [14]. Durch den Verlust von SHP kommt es zum Fehlen des SHP-CYP7A1 Kontroll-Mechanismus und dadurch bei knockout Mäusen zur unregulierten Gallensäuren- Synthese [15].

Gallensäuren binden auch an den Kernrezeptor **PXR** (Pregnane X receptor) und beeinflussen dadurch Biosynthese, Transport und Stoffwechsel der Gallensäuren [16]. PXR-Aktivierung ist besonders wichtig für die Detoxifikation der toxischen Gallensäure Lithocholsäure (LCA) [17]. PXR und FXR können indirekt über die Regulation der SULT2A1 die Detoxifikation von Gallensäuren beeinflussen [18]. Als Rezeptor für die hepatotoxische und potentiell karzinogene LCA wurde auch **VDR** (Vitamin D receptor) beschrieben. Seine Aktivierung durch Gallensäuren oder Vitamin D führt zur CYP3A-Expression, welche u.a. an der Elimination von LCA aus dem Darm und der Leber beteiligt ist [19].

## **1.2 Morbus Crohn**

Morbus Crohn zählt zu den CED und ist durch eine Entzündung aller Darmwandschichten charakterisiert. Die Inzidenz dieser meist schubweise verlaufenden und oft im jüngeren Erwachsenenalter beginnenden Krankheit beträgt in Europa 5-6/100000 Einwohner/Jahr [20].

### **1.2.1 Ätiologie**

Die Ätiologie von MC ist unklar. Ein wesentlicher Hinweis für die Existenz einer genetischen Suszeptibilität sind Zwillingsstudien, die zeigen, dass bei monozygoten Zwillingen eine Erkrankung beider Zwillinge mit 58% deutlich häufiger ist als bei dizygoten Zwillingen (4%). Da bei monozygoten Zwillingen nicht 100% erkranken, werden zusätzliche Co-Faktoren in der Pathogenese diskutiert (z.B. Rauchen, Hygienemaßnahmen in der Kindheit, Störungen der Darmflora, Lebensmittelbestandteile oder spezifische Infektionen wie *Mycobacterium paratuberculosis* und Masern) [21, 22].

### **1.2.2 Pathophysiologie**

Die im Darm vorhandenen Immunzellen reagieren möglicherweise auf luminale Bestandteile (z.B. Bakterien, Viren, Proteine) in einer ungesteuerten/überschießenden Weise und setzen zu diesem Zweck eine Vielzahl von Mediatoren - Zytokine wie TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL1 $\beta$  (Interleukin 1 $\beta$ ), IL2 etc. frei. Diese führen zur Attraktion von Neutrophilen und Makrophagen, die wiederum eine Vielzahl von weiteren Stoffen produzieren (Prostaglandine, Leukotriene, plättchenaktivierender Faktor, Sauerstoffradikale etc.). Die durch

diese Prozesse entstandene Fehlregulierungen der Zellkontakte zwischen den Enterozyten führen zu einer Funktionsstörung der intestinalen Epithelzelle, transmuraler Entzündung sowie Apoptose der Enterozyten [21, 23-25]. Auf eine erhebliche Störung der lokalen Immunregulation bei Patienten mit MC, weist auch die massiv erhöhte Konzentration von aktivierten zytotoxischen T- Zellen in der Lamina propria und im Epithel der betroffenen Darmabschnitte hin[26].

### **1.2.3 Klinisches Bild**

Ausprägung, Schweregrad und Art der Symptome hängen vom Aktivitätsgrad ab [27]. Terminales Ileum und Colon sind am häufigsten betroffen, wobei jeder Teil des Magen-Darm-Traktes vom Mund bis zum Rektum mitbetroffen sein kann. Die Ileocoecal-Region ist in ca. 50% der Fälle betroffen (nur Ileum: 30-40%; nur Colon 20-27%) [28].

Typisch sind junge Erwachsene deren Krankheit mit Schmerzen im rechten unteren Bauchquadranten (mit palpabler Masse), Durchfall und leichtem Fieber beginnt. Häufig nimmt die Krankheit einen chronisch-rezidivierenden Verlauf, der durch Schübe von Durchfällen und Bauchschmerzen charakterisiert ist. Die häufig bei MC beobachtete Anämie resultiert aus der chronischen Entzündung, aus den intestinalen Blutverlusten und bei ausgedehntem Ileumbefall aus einem Vitamin-B-12-Mangel [29]. Neben den obstruierend-stenosierenden und den chronisch-inflammatorischen Subtypen gibt es auch einen Verlauf mit Penetrationen, Abszessen und Fistelbildung. Etwa ein Viertel der an MC erkrankten Patienten leidet an mehr als einer extraintestinalen Manifestation des MC [30], wie Gelenksbeschwerden (sog. „enterohepatische Synovitis“) [31] mit Arthralgien und Arthritiden, Haut und Schleimhautläsionen (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum, Aphthen), Augenveränderungen (Konjunktivitis, Iritis, Uveitis), Leber- und Pankreasbeteiligungen (Fettleber, Pericholangitis, Pankreasfunktionsstörungen) [30].

### **1.2.4 Diagnose**

Die Diagnose erfolgt mittels klinischer Bewertung (siehe oben), Blutwerten (v.a. Leukozytenzahl und CRP) und durch eine Koloskopie und Ileoskopie mit Biopsieentnahmen. Die histologische Aufarbeitung des Biopsiematerials dient der Diagnose, der Aktivitätseinteilung und bei länger bekannten MC zur

Früherkennung eines kolorektalen Karzinoms, welches bei Patienten mit langjähriger Crohn-Colitis verstärkt beobachtet wird. Die Beurteilung von Abszessen und Fisteln mittels transabdominellen Ultraschalls wird durch Computertomographie und Magnetresonanz-Untersuchungen ergänzt [28].

#### **1.2.4.1 CDAI**

Als Goldstandard zur Einteilung der Aktivität der Krankheit dient der CDAI (Chron's disease activity index) [32]. Dieser Score wird aus anamnestischen Angaben des Patienten (Anzahl der weichen Stühle, Grad der Bauchschmerzen und Allgemeinbefinden, extraintestinalen Manifestationen, Medikamentenbedarf), Laborwerten und anhand Daten der klinischen Untersuchung (Gewichtsverlauf, Palpationsbefund) berechnet. Individuelle Ergebnisse werden mit Wichtungsfaktoren multipliziert und zusammengezählt (siehe Tab.7). Ein Aktivitätsindex über 150 Punkten wird als aktive Erkrankung bezeichnet. Werte über 300 weisen auf einen schweren akuten Schub hin. Eine Änderung des CDAI gegenüber Voruntersuchung über 60 Punkte wird als signifikant bewertet [33].

### **1.2.5 Therapie**

#### **1.2.5.1 Glukokortikoide**

Glukokortikoide (z.B. Aprednison<sup>®</sup>) sind die wichtigsten Medikamente in der Behandlung eines akuten Schubs bei MC. Die meistens rasch einsetzende Entzündungshemmung wird jedoch von multiplen Medikamenten-Nebenwirkungen (u.a. Hautödeme, Gewichtszunahme, Osteoporose, Ulcus duodeni etc.) begleitet [34]. Zwar sind heute zahlreiche topische Glucocorticoide mit verminderten systemischen Nebenwirkungen verfügbar (z.B. Budesan<sup>®</sup>), jedoch wird häufig nicht derselbe therapeutische Erfolg erreicht [35]. Aufgrund häufiger Nebenwirkungen wird versucht, die Dosis der Glukokortikoide rasch nach Einsetzen eines klinischen Erfolges zu reduzieren.

#### **1.2.5.2 Aminosalizylate**

5-Aminosalicylate (5-ASA; z.B. Mesalazin<sup>®</sup>, Salofalk<sup>®</sup>) gelten neben Steroiden als Basistherapeutika bei CED [36]. Im klinischen Alltag werden diese Medikamente als Überbrückungsmedikamente zwischen Beendigung der Cortisontherapie und dem Einsetzen der vollen Wirkung des Immunsuppressivums Azathioprin (siehe

unten) eingesetzt. Die Behandlung mit Aminosalizylaten reduziert das Risiko eines Rezidivs und möglicherweise auch einer malignen Transformation [37].

### 1.2.5.3 Immunsuppressiva

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass eine längerdauernde Prophylaxe gegen einen erneuten Schub des MC in Form eines Immunsuppressivums erreicht werden kann. **Azathioprin** (Imurek<sup>®</sup>) ist ein aktiver Metabolit der sog. „Thioguanin – Nukleotide“ und gilt in Europa als „gold standard“ in der Therapie des MC in Remission. Die Therapie beginnt am Beginn eines akuten Schubs, da es seine volle Wirksamkeit erst nach 3-6 Monaten erreicht. Wegen schwerer Nebenwirkungen in 28% der Fälle (u.a. Pankreatitis, Hepatitis, Leukopenie, Fieber, Erbrechen, Infektionen und allergische Reaktionen) müssen engmaschige (Labor-)Kontrollen erfolgen [38, 39]. Alternativen zu Azathioprin in der Behandlung des MC sind **6-Thioguanin** [40] und **MTX** (Methotrexat). MTX kann jedoch auch eine Myelodepression und Hepatotoxizität auslösen, außerdem ist der teratogene Effekt zu beachten [41].

### 1.2.5.4 Biologika

Mehr als 50% der mit Steroiden therapierten MC Patienten entwickeln entweder einen steroidrefraktären oder steroidabhängigen MC [42]. In den letzten Jahren kamen mehrere sogenannte „Biologika“ zur klinischen Anwendung, die gezielt gegen spezifische Entzündungsmediatoren (oder deren Rezeptoren) gerichtet sind. Die meisten wurden in der Rheumatologie entwickelt und werden dort mit großem Erfolg eingesetzt. Mithilfe von diesen Medikamenten können bei MC viele Operationen vermieden werden [43]. Probleme bei der Therapie mit Biologika sind - neben hohen Kosten - das Fehlen von Daten über Langzeitfolgen. **Infliximab** (Remicade<sup>®</sup>) war der erste TNF $\alpha$ -Blocker in klinischer Anwendung und überzeugt bis heute aufgrund der raschen klinischen und morphologischen Wirkung auf die Darmentzündung [44]. Obwohl Infliximab in der Mehrzahl der Fälle gut vertragen wird, wurden mehrere schwerwiegende Nebenwirkungen (wie Fälle von Tuberkulose) beschrieben [45]. **Adalimumab** (Humira<sup>®</sup>) ist ebenfalls ein TNF $\alpha$ -Blocker und hat den Vorteil, dass es nicht i.v. wie Infliximab, sondern subcutan verabreicht werden kann. Der dritte Vertreter dieser Medikamenten-Klasse ist **Etanercept** (Enbrel<sup>®</sup>), welches jedoch am seltensten bei MC eingesetzt wird [46].

### **1.2.5.5 Chirurgie**

Wenn die medikamentöse Therapie ausgeschöpft ist, muß eine chirurgische Intervention erfolgen. Etwa 80% der Patienten mit MC benötigen eine Operation im Laufe ihres Lebens, besonders wenn die Erkrankung den Ileocoecal-Bereich betrifft [47]. Die häufigste Indikation für eine Operation ist eine intestinale-entzündliche Obstruktion, gefolgt von Abdominalabszessen, abdominalen Fisteln, Perforationen und von endoskopisch nicht-beherrschbaren Blutungen [48, 49]. Eine Operation schließt aber ein erneutes Auftreten der Krankheit an einer anderen Stelle des Gastrointestinaltrakts nicht aus. Die Gefahr eines postoperativen Rezidivs ist besonders nach einer Ileumresektion groß, nach Ileocoecal- Resektionen werden seltener Rezidive beobachtet [47]. Das relative Risiko einer malignen Entartung ist bei MC-Patienten deutlich erhöht. Die Wahrscheinlichkeit der Karzinomentstehung ist im kolorektalen Bereich am größten, wobei das Ileum meist keine maligne Veränderungen aufweist [50].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Rekrutierung der Patienten

Das Sammeln von Darmbiopsien stellte die Grundlage für diese Arbeit dar. Zur Rekrutierung der Patienten wurde der Bestellplan für Koloskopien an der Medizinischen Universitätsklinik (Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie) in regelmäßigen Abständen auf die Indikationen der geplanten Koloskopien überprüft. Die Auswahl der Studienpatient/Innen basiert auf Basis von genau definierten Einschluss- und Ausschlusskriterien:

#### **Einschlusskriterien:**

- Patient/Innen mit einem bereits bekannten MC
- Patient/Innen mit dringendem Verdacht auf einen MC
- Patient/Innen, bei denen eine routinemäßige Kontrollkoloskopie zur Vorsorgeuntersuchung durchgeführt wird (diese Patientengruppe diene als Kontrollgruppe)
- Patient/Innen mit anderen medizinischer Indikationen zur Koloskopie
- Medizinische Tauglichkeit für eine Koloskopie
- Mindestalter von 18 Jahre
- Einverständnis der Patient/Innen für die Entnahme zusätzlicher Darmbiopsien

#### **Ausschlusskriterien:**

- Nichteinwilligung der Patient/Innen zur Teilnahme an der Studie
- Ungenügende Darmentleerung zum Zeitpunkt der Koloskopie
- Blutbild und Gerinnung (Quick-Wert, partielle Thromboplastinzeit) älter als 7 Tage
- Einnahme von blutgerinnungshemmenden Medikamenten

## **2.2 Biopsieentnahme**

Patient/Innen, die die Einschlusskriterien erfüllten, wurden im Rahmen des Aufklärungsgesprächs der Koloskopie vom behandelten Oberarzt auf unser Forschungsprojekt hingewiesen und zur Teilnahme an der Studie eingeladen. Für diese Studie lag ein positives Ethikkomiteevotum der Medizinischen Universität Graz vor (Antragsteller Prof. Trauner; EK Nr. 12-159 ex 01/02). Die mittels Zangenbiopsie aus dem terminalen Ileum entnommenen Proben wurden mittels Nummerierung kodiert und bis zur Probenverarbeitung im flüssigen Stickstoff bei ca. -190°C eingefroren.

## **2.3 Datenblatt**

Die Datenerhebung klinischer Daten erfolgt mit Hilfe der Daten-Verarbeitungs-Software „Medocs“. Folgenden Informationen wurden gesammelt: Koloskopie-, Labor- und histologische Befunde, Medikamentenanamnese und relevante Vorerkrankungen der Patient/Innen. Auf diese Weise wurden sowohl anamnestische Daten (Beginn der Beschwerden, Ergebnisse von Voruntersuchungen, aktuelle Medikation etc.), als auch makroskopische und mikroskopische Ergebnisse der Koloskopie zusammengefasst (siehe Anhang 3). Schließlich wurde der Aktivitätsindex CDAI errechnet.

## **2.4 Fall- und Kontrollgruppe**

Diese Arbeit wurde parallel zu einer weiteren Studie durchgeführt, bei der Transporter im Colon von Patienten mit CU untersucht wurden. Daher wurden Biopsien von insgesamt 137 Patienten gewonnen. Davon hatten 31 Patienten MC und 14 Patienten CU (siehe Tab. 1). Der Rest waren Patienten der Kontrollgruppe, wobei nur 9 Patienten keine bekannte Grunderkrankung hatten und im vergleichbaren Alter der MC-Patienten waren. Diese Patienten unterzogen sich einer Kolonkarzinom-Screening-Untersuchung oder litten an rezidivierenden Bauchschmerzen ohne morphologisches Korrelat. Zu betonen ist, dass im Rahmen dieser Studie nur 21 MC Patienten berücksichtigt wurden, bei denen entweder eine Ileitis bzw. Ileitis mit (Pan-)Colitis vorlag oder anamnestisch

beschrieben wurde. 10 Patienten mit Crohn Colitis ohne Ileitis werden im Rahmen einer weiteren Studien untersucht werden.

Folgende homogene Patientengruppen wurden gebildet:

1. Gruppe (n=9): Kontrollpatienten ohne bekannte Grunderkrankung
2. Gruppe (n=14): Patienten mit MC-Ileitis oder MC-Ileitis und -Colitis
3. Gruppe (n=7): Patienten in der Remissionsphase der Erkrankung

## **2.5 Auswertung der Proben mittels RT-PCR**

Im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Universität Graz (ZMF) wurde aus den Ileum-Biopsien RNA isoliert, komplementäre DNA Synthese durchgeführt und daraus mit Hilfe der quantitativen RT-PCR-Methode (TaqMan) unter Mitnahme eines „Housekeeping-Gens“ relevante Expressionsmuster von Gallensäuretransportern (siehe unten) bestimmt.

### **2.5.1 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® 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 20minütigen 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.

### **2.5.2 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).

### **2.5.3 Realtime PCR**

Die wichtigste Methode dieser Arbeit ist die RT-PCR (Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion), worunter man eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren versteht, 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 (s. Tabelle 6).

Die Quantifizierung wurde mit Hilfe des TaqMan®- und SYBR®Green Verfahrens auf dem AB7900HT von Applied Biosystems durchgeführt. TaqMan®-Proben 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-Carboxyfluorescein- hohe Energie) und deren 3'-Ende mit einem „Quencher“-Farbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin- niedrige Energie) markiert sind. Während jeden einzelnen 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 [30]. Bei der SYBR® Green Methode arbeitet man ebenfalls mit 2 Primern, jedoch verwendet man einen speziellen, grünlichen Fluoreszenzfarbstoff (der sogenannte SYBR®Green), der Nukleinsäuren-spezifisch (und nicht Sequenz-spezifisch) an der gebildeten doppelsträngigen DNA bindet und dadurch stärker als freier Farbstoff fluoresziert [31].

## **2.6 Statistische Ausarbeitung**

Die erhaltenen Daten wurden primär auf eine Normal-Verteilung mittels Kruskal-Wallis Test geprüft. Für den Vergleich zweier Gruppen wurden die Variablen mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ein p-Wert  $> 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels PC-Software-Programmen (SPSS).

## **3 Resultate**

### **3.1 Patientencharakterisierung**

#### **3.1.1 Patientenzahl, Geschlecht und Alter**

Wie in 2.4. bereits erwähnt, wurden 3 Gruppen gebildet. In unsere Studie wurden 9 Kontrollpatienten, 14 Patienten mit aktiver MC-Erkrankung und 7 Patienten in klinischer, laborchemischer und histologischer Remission eingeschlossen. Die Kontrollgruppe zählte 4 männliche (44%) und 5 (56%) weibliche Patienten. Von den 14 MC-Ileitis Patienten (4 nur mit Ileitis, 10 Ileitis und Colitis) waren 10 (71%) männlich und 4 (29%) weiblich (Tab. 2a). Von 7 Patienten, die im Remissionsstadium der Krankheit waren, waren alle weiblich. Das Durchschnittsalter der Patienten der Kontrollgruppe war 38 Jahre ( $\pm 9$ ), der MC Ileitis-Patienten 30 Jahre ( $\pm 11$ ) und der Remissionspatienten 39 Jahre ( $\pm 6$ ).

#### **3.1.2 Indikationen und Symptome**

Die häufigste Indikation zur Koloskopie war eine Kontrollkoloskopie bei MC Patienten in Remission, gefolgt von akuten Schüben der Patienten bei bereits bekannten MC (Tab. 2a). Weiters, wurden Koloskopien bei Patienten mit persistierenden abdominalen Beschwerden bei Verdacht auf MC durchgeführt. Die Indikationen der Kontrollpersonen waren Stuhlnregelmässigkeiten, unklare Bauchschmerzen, Verdacht auf MC, Kontrollkoloskopie und unklare Anämie. Leitsymptome sowohl der Kontrollpatienten als auch der Patienten mit akutem Schub waren Bauchschmerzen und Stuhlnregelmässigkeiten. 57% der MC-Patienten in Remission waren beschwerdefrei, die restlichen wiesen abdominelle Beschwerden auf. Im akuten Schub traten Übelkeit und Erbrechen, blutig/eitrig Diarrhö und Arthralgien auf. 5 Patienten mit dem klinisch diagnostizierten akuten Schub wiesen einen CDAI – Wert über 150 auf.

#### **3.1.3 Begleiterkrankungen**

In der Gruppe mit akutem MC-Schub wurden typische extraintestinale Manifestationen beobachtet (Tab. 2b): Spondyloarthropathie (8%), Mb. Bechterew (8%) und aus Vitamin B12-Mangel resultierende Anämie (8%). Als Begleiterkrankungen der Kontrollgruppe waren Gastritis (11%), Cholezystolithiasis

(11%), Eisenmangelanämie (11%), Hämorrhoiden (11%) und Fruktoseintoleranz (11%) zu beobachten.

#### **3.1.4 Anamnese: Medikation**

Die Patienten mit akuten Schub wurden zum Zeitpunkt der Koloskopie mit Prednisolon (7%; n=1), Budesonid (7%), Azathioprin (7%), 6-Thioguanin (14%) und Etanercept (7%) therapiert (Tab. 2b). Bei einem Patienten dieser Gruppe wurde Methotrexat aufgrund einer Azathioprinunverträglichkeit verwendet. Zwei beschwerdefreie Patienten der Remissions-Gruppe (29%) hatten anamnestisch eine Cortisonunverträglichkeit, zwei andere Patienten eine beendete Azathioprin- bzw. Infliximab-Therapie. Kein Patient aus der Kontrollgruppe wurde medikamentös behandelt.

#### **3.1.5 Anamnese: Operationen**

Die häufigste Operation in der Anamnese war eine Ileocoecalresektion (akuter Schub Gruppe 36%; Remissions Gruppe 43%). Je ein Patient (8%) im akuten Schub hatte in der Anamnese eine subtotale Kolektomie, eine Ileocoecalresektion bzw. eine Sigmateilresektion. Analfisteln und Perianalabszesse wurden bei je einem Patienten der Remissions-Gruppe (14%) beschrieben. Keiner der Patienten der Kontrollgruppe hatte eine operative Vorgeschichte (Tab. 2b).

### **3.2 Expressionsmuster**

In der vorliegenden Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als „hauskeeping gen“ verwendet, da es in allen untersuchten Gruppen in nahezu gleicher Menge expremiert wurde und daher keiner transkriptionellen Regulation unterliegt (Tab. 5). Zu erwähnen ist, dass aufgrund technischer Probleme mit wiederholt unglaublich hohen Werten 3 Patienten mit akuten Schub und 2 Patienten der Remissions-Gruppe ausgeschlossen werden mussten.

#### **3.2.1 Positiv-Kontrolle**

Als Positiv-Kontrolle für unsere Studie verwendeten wir iNOS (induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase). Die iNOS wird bei Entzündungsreaktionen stimuliert und ist somit ein indirekter Entzündungsmarker. Bei unseren Patienten war iNOS sowohl in der Gruppe mit akutem Schub (27-fach,  $p < 0.05$ ) als auch in geringerem

Ausmaß auch in der Remissions-Gruppe (4-fach,  $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zwischen den MC-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

### **3.2.2 Gallensäuretransporter**

#### **3.2.2.1 ASBT**

Im akuten Schub der Krankheit zeigten unsere Ergebnisse eine signifikant supprimierte mRNA Expression (36%,  $p = 0,01$ ) des aktiven Gallensäure-Aufnahmesystems ASBT in Bezug auf die Kontrollgruppe. Auch in der Remissions-Gruppe bestand eine signifikante Suppression (53%;  $p = 0,01$ ), die jedoch geringer war als die der aktiven Entzündung. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe im akuten Schub und der Remissions-Gruppe.

#### **3.2.2.2 MRP3**

Interessanterweise war die mRNA-Expression des basalen Efflux-Transporters MRP3 sowohl im akuten Schub (132%) als auch in der Remission (119%) im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht, jedoch waren die Werte nicht signifikant verändert.

#### **3.2.2.3 OST $\alpha$ /OST $\beta$**

Die heterodimeren Transporter OST $\alpha$ /OST $\beta$  zeigten in allen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Im akuten Schub war die mRNA-Expression von OST $\alpha$  leicht erhöht (118%) und in der Remission leicht suppremiert (96%). Im Gegensatz dazu, war die mRNA Expression von OST $\beta$  sowohl im akuten Schub (84%), als auch in der Remission (72%) reduziert.

#### **3.2.2.4 BCRP**

Signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich BCRP im akuten Schub (57%,  $p = 0,02$ ), jedoch in der Remission (67%) knapp nicht. Zwischen beiden MC-Gruppen wurde keine Signifikanz beobachtet.

#### **3.2.2.5 MDR1**

Die mRNA-Expression von MDR1 zeigte weder signifikante Unterschiede im akuten Schub (76%), noch in der Remission (93%).

### **3.2.2.6 I-BABP**

Auch die mRNA-Expression von dem intrazellulären Gallensäure-Transportprotein I-BABP war sowohl im akuten Schub, als auch in der Remission unverändert. Tendenziell war die Expression im akuten Schub (73%) mehr reduziert als in der Remission (90%).

### **3.2.2.7 FXR**

Die mRNA-Expression des Kernrezeptors FXR war im akuten Schub (76%) geringer reduziert als in der Remission (64%), jedoch zeigten sich erneut keine signifikanten Änderungen.

### **3.2.2.8 SHP**

Die Expression von SHP war ebenfalls unverändert, es zeigten sich annähernd gleiche mRNA-Expressionen in beiden MC-Gruppen (105% bzw. 104%).

### **3.2.2.9 PXR**

Keine signifikanten Unterschiede waren auch bei PXR zu beobachten. Die mRNA-Expressionsmuster der Gruppe im akuten Schub (88%) und der Remissions-Gruppe (79%) waren vergleichbar mit den Kontrollen.

### **3.2.2.10 VDR**

Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expressionsmuster des VDR nachgewiesen. Ähnlich wie bei ASBT, I-BABP, BCRP und MDR1 zeigte sich eine geringere mRNA-Verminderung in der Remissions-Phase (90%) im Vergleich zum akuten Schub (74%).

### **3.2.2.11 SULT2A1**

Signifikant reduziert zeigte sich die mRNA-Expression von SULT2A1 (31%,  $p=0,01$ ) im akuten Schub, jedoch nicht in der Remissions-Gruppe (102%) . Signifikant war ebenfalls der Unterschied zwischen Patienten mit akuten Schub und Remission ( $p=0,02$ ).

### **3.2.2.12 TNF $\alpha$**

Es zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede in allen drei Gruppen. Überraschend war, dass die mRNA-Expression des proinflammatorischen Enzyms

TNF $\alpha$  im akuten Schub nur leicht erhöht war (115%) und im Gegensatz dazu während der Remission etwas höher expremiert war (261%).

### **3.2.3 Laborwerte**

Im Rahmen dieser Studie wurden die CRP-Werte und Leukozytenzahl als relevante Entzündungswerte analysiert (Tab. 4).

Die CRP-Werte der akuten MC-Gruppe waren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, jedoch nicht signifikant ( $22\pm 30$  mg/l). Zwischen Kontroll- und Remissions-Gruppe ( $3\pm 2$  mg/l) zeigte sich ebenfalls keine Signifikanz.

Bei den Leukozytenzahlen zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen - weder bei der Gruppe im akuten Schub ( $8432\pm 4837/\mu\text{l}$ ), als auch nicht in der Remissions-Gruppe ( $6128\pm 1729/\mu\text{l}$ ).

## 4 Diskussion

Im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes zirkulieren Gallensäuren mehrmals täglich zwischen Darm und Leber. Dafür ist ein koordiniertes Zusammenspiel von Transportproteinen in Hepatozyten und Enterozyten des terminalen Ileums - dem Hauptort der Gallensäuren-Resorption - notwendig [12]. Bei einer intestinalen Entzündung im Rahmen eines MC mit massiven Zelluntergängen im Ileum sind Änderungen der Transporter-Expressionen in den noch vitalen Enterozyten zu erwarten. Voruntersuchungen zeigten bei MC-Patienten eine signifikante Suppression des wichtigsten apikalen Aufnahmesystems ASBT [51]. Dies wäre erklärbar mit einem Phänomen, welches auch während Akut-Phase-Reaktionen in der Leber zu beobachten ist: proinflammatorische Entzündungsmediatoren führen zur Suppression der meisten Gallensäuretransporter, wodurch es in der Leber zur Sepsis-induzierten Cholestase kommt [52, 53]. Außer der ASBT Suppression sind die Expressionsänderungen anderer Gallensäure-Transporter im akuten MC-Schub bisher nicht ausreichend beschrieben worden. Prinzipiell könnte man von zwei Reaktionsmuster ausgehen: entweder kommt es wie in der Akut-Phase-Reaktion der Leber zur generellen Suppression fast aller Gallensäure-Transporter, oder es kommt zur teilweisen Suppression und kompensatorischen Induktion anderer Transporter, damit der enterohepatische Kreislauf bestmöglich aufrecht erhalten bleibt.

Unsere Daten zeigen auch eine signifikante Reduktion der ASBT mRNA Expression auf 36%, welche während der Remission mit etwas über 50% anhält. Daher könnte bei MC-Patienten eine verminderte Gallensäureaufnahme über den Natrium-abhängigen Transporter ASBT bestehen. Wir konnten auch zeigen, dass es durch die signifikante Expressions-Reduktion des Enzyms SULT2A1 zur möglichen Sulfatierungsstörung der Gallensäuren im Enterozyten des Ileums kommt. Jedoch könnte dieser Expressionsrückgang auf etwa 31% im akuten MC-Schub eine Folge des verminderten Gallensäureimports durch die Expressionsminderung von ASBT sein. Das Fehlen von sulfatierten Gallensäuren intrazellulär könnte im Sinne eines „feedback-Mechanismus“ zur verminderten mRNA-Expression des apikalen Export-Transporters BCRP führen. Damit im

Einklang ist die in unseren Patienten beobachtete signifikante Expressionsminderung von BCRP auf 51%.

Unsere Daten zeigen, dass nur die erwähnten drei mRNA-Expressionen signifikant vermindert waren und alle anderen untersuchten Transporter (wie z.B. die basalen Exporttransporter OST $\alpha/\beta$  oder MRP3) und Kernrezeptoren (z.B. der Gallensäurenrezeptor FXR) sich unverändert zeigten. Somit stellt sich die Frage, durch welchen Mechanismus die reduzierte Gallensäure-Aufnahme in den Enterozyten durch die verminderte ASBT-Expression kompensiert wird. Eine Möglichkeit wäre eine gesteigerte passive Diffusion. Im Rahmen der Ileitis könnte es zur vermehrten bakteriellen Besiedelung des Ileums kommen und dadurch - wie im Kolon - durch die Bakterien die Gallensäuren dekonjugiert werden. Die Gallensäuren würden lipophiler werden, wodurch die passive Diffusion erleichtert wäre. Höchstwahrscheinlich kann eine passive Diffusion eine aktive Aufnahme jedoch nicht kompensieren, weswegen der Import von Gallensäuren in den Enterozyten durch ein weiteres Transportsystem stattfinden könnte. In der Literatur wurde als Natrium-unabhängiger Transporter OATP-A (organic anion transporting polypeptide A) bzw. im Tiermodell OATP3 beschrieben [54], welcher jedoch vor allem im Jejunum exprimiert wird. Kompensatorisch bzw. in Folge der pH Änderung im Rahmen der bakteriellen Besiedelung könnte dieser Transporter während einer Ileitis auch im Ileum verstärkt exprimiert werden, jedoch sind zum Beweis dieser Hypothese weiterführende Studien notwendig. Zuletzt wurde auch die Expression von OATP2B1 im terminalen Ileum nachgewiesen [55], welche bei MC-Patienten gesteigert war [56]. Jedoch ist bisher unklar, ob dieses sehr selektiv transportierende Protein eine Affinität für Gallensäuren aufzeigt.

Bemerkenswert erscheint die Tatsache, dass zwar die Positivkontrolle in Form des indirekten Endzündungsmarker iNOS stark induziert war (27-fache mRNA Expression im akuten Schub, 4-fache in der Remission), jedoch der „klassische“ Entzündungsmediator TNF  $\alpha$  keine signifikante Expressionssteigerung aufwies, obwohl histologisch eine eindeutige Aktivität bestand (Daten nicht gezeigt). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass mRNA prinzipiell „posttranskriptionale Modifizierungen“ (z.B. Splicing etc.) durchmachen kann und wir mit unserer Methode nur die mRNA-Expression ohne posttranskriptionale Modifizierungen

bestimmen können und auch nicht die Aktivität eines Proteins erfassen. Auf der anderen Seite könnte auch die Dauermedikation der MC-Patienten die mRNA-Expressionen beeinflussen. Die meisten unserer Patienten wurden bereits seit längerer Zeit mit einem Immunsuppressivum oder mit Biologika behandelt (Tab. 3). Interessanterweise kam es durch Aufteilung der einzelnen Subgruppen zu keinen Ergebnis-Änderungen (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse wurden auch nicht beeinflusst durch Auftrennung der Patienten je nach Entzündungslokalisation (nur Ileitis vs. Ileitis und Colitis), je nach CDAI und auch nicht durch Beachtung der Voroperationen (Tab. 2b). Vor allem bei den letztgenannten Patienten mit einem neo-terminalen Ileum bei St.p. Ileocoekalresektion dürften die Enterozyten im neoterminalen Ileum bereits die gleiche Transportkapazität der fehlenden Enterozyten des terminalen Ileums übernommen haben.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass bei MC-Patienten die apikale Gallensäureaufnahme in den Enterozyten des terminalen Ileums bei MC-Patienten – im Schub, aber auch in der Remission – über den bisher bekannten Transporter ASBT stark eingeschränkt ist. Die Abgabe ins Portalblut scheint unverändert und unbeeinflusst von der Darmentzündung über die bekannten Transporter zu erfolgen. Eine Studie in diesen Krankheitsstadien ist aufgrund der vielen Bias (Vor- und Begleiterkrankungen, Voroperationen, Medikamentenanamnesen etc.) nur teilweise aussagekräftig. Daher sind künftig Studien mit Biopsien von naiven, nicht behandelten Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose anzustreben.

## Anhang 1 – Tabellen

Tabelle 1: Anzahl der Patienten

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

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

Tabelle 2a: Patientencharakterisierung Teil 1

	<b>Kontrolle n=9</b>	<b>MC-Ileitis n=14</b>	<b>Remission n=7</b>
<b>Geschlecht</b>			
Männlich	4 (44)	10 (71)	-
Weiblich	5 (56)	4 (29)	7 (100)
<b>Alter (MW±SD)</b>	38 ± 9	30 ± 11	39 ± 6
<b>Indikationen zur Koloskopie</b>			
Kontrollkoloskopie	1 (11)	4 (29)	7 (100)
Verdacht auf MC	2 (22)	3 (21)	-
MC Schub	-	6 (43)	-
Stuhlunregelmäßigkeiten	3 (33)	-	-
Unklare Bauchschmerzen	2 (22)	-	-
Unklare Anämie	1 (11)	-	-
<b>Symptome vor Koloskopie</b>			
Beschwerdefrei	2 (22)	2 (15)	4 (57)
Stuhlunregelmäßigkeiten	8 (89)	4 (31)	2 (29)
Bauchschmerzen	8 (89)	4 (31)	1 (14)
Übelkeit/Erbrechen	-	2 (15)	-
Arthralgie	-	1 (8)	-
Diarrhoe > 3 Tage	-	1 (8)	-
Anämie	1 (11)	-	-

Tabelle 2b: Patientencharakterisierung Teil 2

	<b>Kontrolle n=9</b>	<b>MC-Ileitis n=14</b>	<b>Remission n=7</b>
<b>Begleiterkrankungen</b>			
Gastritis	1 (11)	-	-
Cholezystolithiasis	1 (11)	-	-
Vitamin B12 Mangel	-	1 (8)	-
Eisenmangelanämie	1 (11)	1 (8)	2 (29)
Spondyloarthropathie	-	1 (8)	1 (14)
Mb. Bechterew	-	1 (8)	-
Hämorrhoiden	1 (11)	-	-
Fruktoseintoleranz	1 (11)	-	-
<b>Medikamentenunverträglichkeit</b>			
Cortisonunverträglichkeit	-	-	2 (29)
Azathioprinunverträglichkeit	-	1 (8)	-
<b>Anamnese: Medikamente</b>			
St.p. Azathioprin (Imurek <sup>®</sup> )	-	1 (8)	1 (14)
St.p. Methotrexat-Therapie	-	1 (8)	-
St.p. Infliximabtherapie (Remicade <sup>®</sup> )	-	-	1 (14)
<b>Anamnese: Operationen</b>			
St.p. Ileocoecalresektion	-	5 (36)	3 (43)
St.p. Sigmateilresektion	-	1 (8)	-
St.p. Subtotale Kolektomie	-	1 (8)	-
St.p. Analfisteln	-	-	1 (14)
St.p. Perianalabszess-Operation	-	-	1 (14)

Tabelle 3: Medikation zum Zeitpunkt der Koloskopie

<b>Medikament</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Kontrolle n=9</b>	<b>MC-Ileitis n=14</b>	<b>Remission n=7</b>
<b>Prednisolon</b>	Aprednislon®	-	1 (7)	-
<b>Budesonid</b>	Entocortin®	-	1 (7)	1 (14)
<b>Azathioprin</b>	Imurek®	-	1 (7)	1 (14)
<b>6-Thioguanin</b>		-	2 (14)	-
<b>Infliximab</b>	Remicade®	-	-	1 (14)
<b>Adalimumab</b>	Humira®	-	-	1 (14)
<b>Etanercept</b>	Enbrel®	-	1 (7)	-
<b>Calcium-Carbonat</b>	Cal-D-Vita®	-	1 (7)	-
<b>Lornoxicam (NSAR)</b>	Xefo®	-	2(14)	-

Tabelle 4: Labor: Serumdaten (MW±SD)

<b>Serum-CRP</b>	<b>Kontrolle n=6</b>	<b>MC-Ileitis n=10</b>	<b>Remission n=3</b>
<b>(mg/l)</b>	26 ± 40	22 ± 30	3 ± 2
<b>Leukozyten</b>	<b>Kontrolle n=6</b>	<b>MC-Ileitis n=10</b>	<b>Remission n=4</b>
<b>(/µl)</b>	5935 ± 1582	8432 ± 4837	6128 ± 1729

Tabelle 5: mRNA Expressionsmuster von Gallensäure-Transportern/GAPDH

(%)	Kontrolle n=7	MC-Schub n=14	Remission n=7
<b>ASBT</b>	100 ± 27	<b>36 ± 34*</b>	<b>53 ± 32*</b>
<b>MRP3</b>	100 ± 35	132 ± 61	119 ± 43
<b>OST<math>\alpha</math></b>	100 ± 38	118 ± 84	96 ± 83
<b>OST<math>\beta</math></b>	100 ± 33	84 ± 55	72 ± 47
<b>I-BABP</b>	100 ± 46	73 ± 64	90 ± 90
<b>FXR</b>	100 ± 29	76 ± 38	64 ± 28
<b>SHP</b>	100 ± 21	105 ± 87	104 ± 58
<b>PXR</b>	100 ± 16	88 ± 52	79 ± 30
<b>VDR</b>	100 ± 27	74 ± 28	90 ± 29
<b>SULT2A1</b>	100 ± 49	<b>31 ± 37*</b>	102 ± 78
<b>BCRP</b>	100 ± 29	<b>57 ± 41*</b>	67 ± 28
<b>MDR1</b>	100 ± 21	76 ± 50	93 ± 44
<b>GAPDH</b>	100 ± 31	129 ± 69	155 ± 76
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	100 ± 72	127 ± 115	261 ± 268
<b>INOS#</b>	100 ± 92	<b>2743 ± 1352*</b>	<b>410 ± 414*</b>

\* p<0.05

# INOS: MC-Schub n=11, Remission n=5

Tabelle 6: Ergänzung zu 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  + 2 µl 0,1M DTT  + 0,5 µl Super Script (reverse Transkriptase)  + 0,3 µl dNTP Mix (Nukleotide)  + 0,5 µl RNAase-Inhibitor  + 2,7 µl Aqua dest</p> <p><b>&gt; Thermo Cyclers-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  + 0,7 µl reverse Primer  + 10,5 µl Master Mix</p>

Tabelle 7: CDAI

<b>Klinische oder laborchemische Variable</b>	<b>Wichtungsfaktor</b>
Anzahl der ungeformten Stuhlgängen in den letzten sieben Tagen	X2
Bauchschmerzen (0=keine, 1=leicht, 2=mittel, 3=stark) als Summe der letzten sieben Tage	X5
Allgemeinbefinden (0=gut, 1=beeinträchtigt, 2=schlecht, 3=sehr schlecht, 4=unerträglich) als Summe der letzten sieben Tage	X7
Anwesenheit von Komplikationen	X20
Symptomatische Durchfallbehandlung	X30
Abdominelle Resistenz (0=nein, 2=fraglich, 5=sicher)	X10
Abweichung des Hämatokrit von 47 % bei Männern und 42 % bei Frauen	X6
Prozentuale Abweichung vom Standardgewicht	X1

## **Anhang 2 – Projektplan**

### **Organisatorisches Management**

#### **Zeitlicher Ablauf**

- *Juli 2008*: Erste Kontaktaufnahme mit Univ. Doz. Dr. Peter Fickert
- *September 2008 - Jänner 2009*: Darmbiopsien-Sammlung
- *Jänner 2009*: Bekanntgabe des Titels der Diplomarbeit
- *Jänner 2009 - November 2009*: Laboranalyse der Darmbiopsien, Literatur-Recherche, Datenanalyse
- *April 2010*: Abgabe der Diplomarbeit

#### **Betreuung der Diplomarbeit**

Laut Richtlinien der „Erstellung einer Diplomarbeit an der Medizinischen Universität Graz“ wird das Verfassen der Diplomarbeit von einem Lehrenden des Fachbereichs betreut, in diesem Fall von Univ. Doz. Dr. Peter Fickert und begutachtet von Univ. Prof. Dr. Michael Trauner, der ebenso aus dem Kreis der Lehrenden kommt.

Die Betreuer der Diplomarbeit stehen für die fachliche Unterstützung und für die Diskussion stets mittels Telefon, persönlich oder mittels E-mail zur Verfügung.

#### **Externe Hilfeleistungen**

- *Biopsieren und Probensammlung*: Fachärzte der Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie
- *Laboranalysen und Einschulung des Studenten*: Medizintechnische Laborfachkraft des ZMF
- *Statistische Aspekte der Diplomarbeit, Auswertungsstrategien und Anwendung statistischer Software*: Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Dokumentation

## Anhang 3 – Datenblatt zur Studie

Datum der Koloskopie:

Interne Nummer:

Körpergewicht:

Körpergröße:

BMI:

Indikation zur Koloskopie:

Andere Erkrankungen:

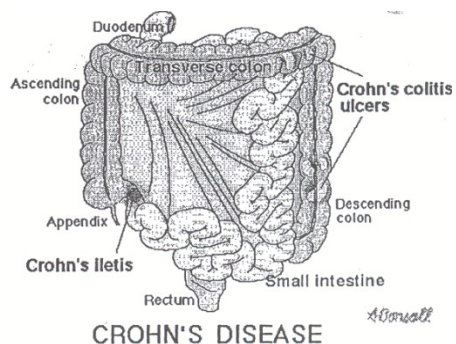
Medikation:

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 4 – 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.

## **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 (Polymerasekettenreaktion, 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.

### **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 gewonnenen 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.

### **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.

### **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.

### **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.

**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.

**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.

**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.

## **Anhang 5 – Lebenslauf**

### **Persönliche Daten:**

Name: Slaviša Dujaković

Adresse: Schönaugasse 102A/2, 8010 Graz, Österreich

Geburtsdaten: 29.9.1981 in Banja Luka, Bosnien und Herzegowina

Staatsangehörigkeit: Bosnien und Herzegowina

Familienstatus: Ledig

### **Ausbildung:**

- 1988 – 1966: Volksschule, Čelinac
- 1996 – 2000: Gymnasium, Banja Luka
- 2000 – 2002: Medizinische Fakultät Banja Luka
- Seit 2003: Medizinische Universität Graz

### **Projekte, Forschungen, Auslandsaufenthalte:**

- 1.9.2007 – 1.10.2007: Forschungsprojekt „Biological signal processing“, Lissabon, Portugal
- 1.8.2008 – 1.9.2008: Klinisches Clerkship, Cairo Dental Faculty, Ägypten
- Oktober 2008 – März 2010: Forschungsprojekt “Molecular alterations of intestinal bile acid homeostasis in inflammatory bowel disease”, Medizinische Universität Graz
- 1.9.2009 – 25.9.2009: Klinisches Internship, Department of Dentistry, University of Virginia Health System, Charlottesville, Virginia, USA

### **Arbeitserfahrung:**

- Teslazentrum für Studierende der Region Banja Luka - Vorstandsobmann
- Assoziation für Kommunikation und Informatik „Trust-B“ – Präsident der Generalversammlung
- SFOR: Dolmetscher –Serbokroatisch-Englisch
- Ffadfinder –Union der Serbischen Republik: Chef der Abteilung für internationale Kooperation

### **Seminare:**

- Care International: Kommunikation und PR-Management
- Nansen Dialogue Centre: Kommunikation und Rhetorik

### **Auszeichnungen:**

- Stipendium des Präsidenten der Serbischen Republik 2007/2008

### **Sprachkenntnisse:**

- Serbokroatisch (Muttersprache)
- Deutsch: in Wort und Schrift
- Englisch: in Wort und Schrift

## Anhang 6 – Literaturverzeichnis

1. Burke, K.T., et al., *Hepatic bile acid metabolism in the neonatal hamster: expansion of the bile acid pool parallels increased Cyp7a1 expression levels*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **297**(1): p. G144-51.
2. Meier, P.J. and B. Stieger, *Bile salt transporters*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 635-61.
3. 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.
4. Landrier, J.F., et al., *The gene encoding the human ileal bile acid-binding protein (I-BABP) is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors*. Biochim Biophys Acta, 2005. **1735**(1): p. 41-9.
5. Alrefai, W.A. and R.K. Gill, *Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1803-23.
6. Echchgadda, I., et al., *Dehydroepiandrosterone sulfotransferase is a target for transcriptional induction by the vitamin D receptor*. Mol Pharmacol, 2004. **65**(3): p. 720-9.
7. Allen, J.D. and A.H. Schinkel, *Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(6): p. 427-34.
8. Ho, G.T., F.M. Moodie, and J. Satsangi, *Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastrointestinal disease?* Gut, 2003. **52**(5): p. 759-66.
9. Trezise, A.E., et al., *The multidrug resistance and cystic fibrosis genes have complementary patterns of epithelial expression*. EMBO J, 1992. **11**(12): p. 4291-303.
10. Dommels, Y.E., et al., *Characterization of intestinal inflammation and identification of related gene expression changes in mdr1a(-/-) mice*. Genes Nutr, 2007. **2**(2): p. 209-23.

11. Staley, E.M., T.R. Schoeb, and R.G. Lorenz, *Differential susceptibility of P-glycoprotein deficient mice to colitis induction by environmental insults*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(5): p. 684-96.
12. Trauner, M. and J.L. Boyer, *Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(2): p. 633-71.
13. Lammert, F. and T. Sauerbruch, *Mechanisms of disease: the genetic epidemiology of gallbladder stones*. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 2005. **2**(9): p. 423-33.
14. Lu, T.T., et al., *Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors*. *Mol Cell*, 2000. **6**(3): p. 507-15.
15. Kerr, T.A., et al., *Loss of nuclear receptor SHP impairs but does not eliminate negative feedback regulation of bile acid synthesis*. *Dev Cell*, 2002. **2**(6): p. 713-20.
16. Staudinger, J.L., et al., *The nuclear receptor PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3369-74.
17. Xie, W., et al., *An essential role for nuclear receptors SXR/PXR in detoxification of cholestatic bile acids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3375-80.
18. Kim, M.S., et al., *Suppression of DHEA sulfotransferase (Sult2A1) during the acute-phase response*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004. **287**(4): p. E731-8.
19. Makishima, M., et al., *Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor*. *Science*, 2002. **296**(5571): p. 1313-6.
20. Shivananda, S., et al., *Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)*. *Gut*, 1996. **39**(5): p. 690-7.
21. Fiocchi, C., *Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis*. *Gastroenterology*, 1998. **115**(1): p. 182-205.
22. Cosnes, J., et al., *Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease*. *Gastroenterology*, 1996. **110**(2): p. 424-31.

23. Nakamura, M., et al., *Cytokine production in patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 1992. **33**(7): p. 933-7.
24. Ljuca, F., et al., *Circulating Cytokines Reflect Mucosal Inflammatory Status in Patients with Crohn's Disease*. Dig Dis Sci, 2009.
25. Polinska, B., J. Matowicka-Karna, and H. Kemonia, [*The cytokines in inflammatory bowel disease*]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2009. **63**: p. 389-94.
26. Caballero, T., et al., *Intraepithelial and lamina propria leucocyte subsets in inflammatory bowel disease: an immunohistochemical study of colon and rectal biopsy specimens*. J Clin Pathol, 1995. **48**(8): p. 743-8.
27. J.-M. Hahn, G.T.V., Stuttgart, *Checkliste Innere Medizin*. 2003.
28. Wills, J.S., I.F. Lobis, and F.J. Denstman, *Crohn disease: state of the art*. Radiology, 1997. **202**(3): p. 597-610.
29. R.N. Fedorak, A.B.R.T., *Inflammatory bowel disease 2000*: p. 306.
30. Rogler, G. and J. Scholmerich, [*Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease*]. Med Klin (Munich), 2004. **99**(3): p. 123-30.
31. Sons, H.U., et al., [*Orthopedic aspects of Crohn disease. Examples of extra-intestinal organ manifestations*]. Beitr Orthop Traumatol, 1990. **37**(10): p. 539-44.
32. Yoshida, E.M., *The Crohn's Disease Activity Index, its derivatives and the Inflammatory Bowel Disease Questionnaire: a review of instruments to assess Crohn's disease*. Can J Gastroenterol, 1999. **13**(1): p. 65-73.
33. Best, W.R., et al., *Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study*. Gastroenterology, 1976. **70**(3): p. 439-44.
34. Rutgeerts, P., *The use of oral topically acting glucocorticosteroids in the treatment of inflammatory bowel disease*. Mediators Inflamm, 1998. **7**(3): p. 137-40.
35. Lamers, C.B., et al., *Budesonide in inflammatory bowel disease*. Neth J Med, 1996. **48**(2): p. 60-3.
36. Reinisch, W., et al., [*Immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: consensus by the Austrian working group on IBD*]. Z Gastroenterol, 2004. **42**(9): p. 1033-45; discussion 1046-7.

37. Lemann, M., [*Treatment of chronic inflammatory bowel diseases*]. Bull Acad Natl Med, 2007. **191**(6): p. 1125-41; discussion 1141.
38. Fraser, A.G., T.R. Orchard, and D.P. Jewell, *The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review*. Gut, 2002. **50**(4): p. 485-9.
39. Sandborn, W.J., *Azathioprine: state of the art in inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol Suppl, 1998. **225**: p. 92-9.
40. Herrlinger, K.R., et al., *6-thioguanine--efficacy and safety in chronic active Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(4): p. 503-8.
41. Ardizzone, S. and G. Bianchi Porro, *Biologic therapy for inflammatory bowel disease*. Drugs, 2005. **65**(16): p. 2253-86.
42. Munkholm, P., et al., *Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease*. Gut, 1994. **35**(3): p. 360-2.
43. Oussalah, A., et al., *Adalimumab for Crohn's disease with intolerance or lost response to infliximab: a 3-year single-centre experience*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. **29**(4): p. 416-23.
44. Kurtovic, J. and I. Segal, *Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease*. Trop Gastroenterol, 2004. **25**(1): p. 9-14.
45. Sandborn, W.J. and W.A. Faubion, *Biologics in inflammatory bowel disease: how much progress have we made?* Gut, 2004. **53**(9): p. 1366-73.
46. Sandborn, W.J., et al., *Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2001. **121**(5): p. 1088-94.
47. Bernell, O., A. Lapidus, and G. Hellers, *Risk factors for surgery and recurrence in 907 patients with primary ileocaecal Crohn's disease*. Br J Surg, 2000. **87**(12): p. 1697-701.
48. Higuero, T., et al., *Jejunioileal Crohn's disease: a case-control study*. Gastroenterol Clin Biol, 2004. **28**(2): p. 160-6.
49. Alos, R. and J. Hinojosa, *Timing of surgery in Crohn's disease: a key issue in the management*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(36): p. 5532-9.
50. Canavan, C., K.R. Abrams, and J. Mayberry, *Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(8): p. 1097-104.

51. Jung, D., et al., *Human ileal bile acid transporter gene ASBT (SLC10A2) is transactivated by the glucocorticoid receptor*. *Gut*, 2004. **53**(1): p. 78-84.
52. Zollner, G., et al., *Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases*. *Hepatology*, 2001. **33**(3): p. 633-46.
53. Trauner, M., P. Fickert, and R.E. Stauber, *[New molecular aspects of cholestatic liver diseases]*. *Z Gastroenterol*, 1999. **37**(7): p. 639-47.
54. Walters, H.C., et al., *Expression, transport properties, and chromosomal location of organic anion transporter subtype 3*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000. **279**(6): p. G1188-200.
55. Meier, Y., et al., *Regional distribution of solute carrier mRNA expression along the human intestinal tract*. *Drug Metab Dispos*, 2007. **35**(4): p. 590-4.
56. Wojtal, K.A., et al., *Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients*. *Drug Metab Dispos*, 2009. **37**(9): p. 1871-7.