

Aus der Klinik für Innere Medizin II  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar  
Direktor: Prof. Dr. S. Zeuzem

**Analyse der Bedeutung der MLH1-I219V Alteration für  
die Entstehung und den Verlauf von Colitis ulcerosa und  
die Aktivität der humanen Mismatch Reparatur**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2008

Vorgelegt von  
Anna Spina  
geboren am 16.04.1983 in Saarbrücken

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>1. SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>8</b>
2.1 CHRONISCH-ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN (CED).....	8
2.1.1 <i>Diagnose</i> .....	9
2.2 COLITIS ULCEROSA.....	10
2.2.1 <i>Klinik und Pathologie</i> .....	10
2.2.2 <i>Therapie</i> .....	13
2.2.3 <i>Epidemiologie</i> .....	14
2.2.4 <i>Ätiologie und Pathogenese</i> .....	15
2.3 DIE POSTREPLIKATIVE DNA-MISMATCH-REPARATUR (MMR) .....	21
2.3.1 <i>Wichtige Komponenten des MMR-Systems</i> .....	22
2.3.2 <i>Strangdiskriminierung</i> .....	23
2.3.3 <i>Modelle zur Reparaturinitiation</i> .....	23
2.3.4 <i>Reparaturablauf</i> .....	24
2.4 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN MLH1, DEM LYNCH-SYNDROM UND COLITIS ULCEROSA .....	25
2.5 ZIELE DER ARBEIT.....	27
<b>3.MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
3.1 PATIENTEN UND MATERIALIEN .....	28
3.1.1 <i>Labogerät</i> .....	28
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	29
3.1.3 <i>Verwendete Kit-Systeme</i> .....	30
3.1.4 <i>Allgemeine Chemikalien</i> .....	30
3.1.5 <i>Molekularbiologische Chemikalien</i> .....	31
3.1.6 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	32
3.1.7 <i>Verwendete Antikörper</i> .....	35
3.1.8 <i>Medien</i> .....	36
3.1.9 <i>Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien</i> .....	37
3.1.10 <i>Eukaryontische Expressions- und Klonierungsvektoren</i> .....	37
3.1.11 <i>Patienten und Kontrollgruppe</i> .....	39
3.2 METHODEN .....	41
3.2.1 <i>Aufbereitung der Blutproben und Gewinnung der genomischen DNA</i> .....	41
3.2.2 <i>Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	41
3.2.3 <i>Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten</i> .....	43
3.2.4 <i>Aufreinigung der DNA-Fragmente</i> .....	43
3.2.5 <i>Sequenzierung</i> .....	43
3.2.6 <i>Site directed mutagenesis</i> .....	44
3.2.7 <i>Transformation der Plasmide in E.coli</i> .....	46
3.2.8 <i>Plasmid-Mini-Präparation</i> .....	46
3.2.9 <i>Plasmid- Maxi-Präparation</i> .....	46
3.2.10 <i>Kultivierung von HEK 293T Zellen</i> .....	47
3.2.11 <i>Calciumphosphat-Transfektion von 293T Zellen</i> .....	47
3.2.12 <i>Native Gesamtproteinextraktion</i> .....	48
3.2.13 <i>SDS-Disc-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Disc-PAGE)</i> .....	49
3.2.14 <i>Western Blot</i> .....	50
3.2.15 <i>Immunologischer Nachweis der Proteine durch Antikörper</i> .....	50
3.2.16 <i>Mismatch-Reparatur-Assay (MMR-Assay)</i> .....	51
3.2.17 <i>In Silico-Analyse</i> .....	53
3.2.18 <i>Statistische Auswertung</i> .....	53
3.2.19 <i>Ethische Aspekte</i> .....	54
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>

4.1 UNTERSUCHUNG DES POLYMORPHISMUS 655 A>G BEI PATIENTEN MIT COLITIS ULCEROSA .....	55
4.1.1 Ermittlung der Genotypverteilung .....	55
4.1.2. Genotyphäufigkeiten.....	57
4.1.3 Geschlechtsverteilung.....	58
4.1.4 Alter der Patienten und Alter bei Erstdiagnose.....	59
4.1.5 Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung .....	60
4.1.6 Therapie.....	62
4.2 ROLLE VON I219 FÜR DIE MLH1-FUNKTION.....	63
4.2.1 Position von I219 innerhalb der strukturellen und funktionellen Einheit des MLH1-Proteins .....	64
4.2.2 Mögliche Konsequenzen des Austauschs von Isoleucin nach Valin .....	65
4.2.3 Sequenzalignment von MLH1-I219 .....	66
4.3 AUSWIRKUNG DES MLH1-I219V POLYMORPHISMUS AUF DIE DNA-MISMATCH-REPARATURFUNKTION...	67
4.3.1 Expression der MLH1-Proteine.....	68
4.3.2 Überprüfung der MLH1-Mismatch-Repair-Funktion.....	69
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>73</b>
5.1 VORKOMMEN DES MLH1-I219V POLYMORPHISMUS BEI PATIENTEN MIT COLITIS ULCEROSA.....	74
5.1.1 Zusammenhang zwischen der Genotypverteilung und der refraktären Colitis ulcerosa .....	74
5.2 ANALYSE DER AUSWIRKUNG VON MLH1-I219V AUF DIE DNA-MISMATCH-REPARATUR .....	75
5.2.1 Bioinformatisch-theoretische Betrachtung der I219V-Alteration.....	75
5.2.2 Biochemische Evaluierung der Auswirkung von MLH1-I219V auf die DNA-Mismatch-Reparatur...	76
5.2.3 Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Studien.....	76
5.2.4 Fazit.....	78
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7. PUBLIKATIONEN/DANKSAGUNG .....</b>	<b>88</b>
<b>8. LEBENS LAUF .....</b>	<b>89</b>

# 1. Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen umfasst die beiden Krankheitsentitäten Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Trotz intensiver Forschung während der vergangenen Jahre bleiben Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung bislang noch weitgehend ungeklärt. Neben genetischen Faktoren werden Umwelteinflüsse, infektiöse Ursachen und immunologische Fehlregulationen diskutiert. Der Verdacht genetischer Ursachen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen begründet sich vor allem auf der immer wieder dokumentierten familiären Häufung und der hohen Konkordanz bei monozygoten Zwillingen. Durch zahlreiche genomweite Untersuchungen und Kopplungsanalysen konnten bislang neun Suszeptibilitätsregionen (IBD1-IBD9), die die individuelle genetische Prädisposition für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung bedingen, auf insgesamt 12 Chromosomen nachgewiesen werden. Eine dieser Suszeptibilitätsregionen ist der IBD9-Locus, der auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert ist und der, neben anderen Kandidatengenen, das DNA-Mismatch-Reparaturgen *MLH1* enthält. Der Verlust von *MLH1* führt durch den Ausfall der DNA-Mismatch-Reparatur zur Entstehung einer Mikrosatelliteninstabilität. Eine derartige Mikrosatelliteninstabilität konnte auch in der Kolonmukosa von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden. In einer kürzlich erschienenen italienischen Studie konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem homozygoten Auftreten des Polymorphismus 655 A>G (I219V) im *MLH1*-Gen und einer refraktären Form der Colitis ulcerosa gezeigt werden. Inwieweit dieser Polymorphismus die Funktion des MLH1-Proteins tatsächlich beeinträchtigt, wurde zu diesem Zeitpunkt noch kontrovers diskutiert.

Das Ziel unserer Arbeit bestand nun darin, zu untersuchen, ob es zwischen dem Auftreten der MLH1-I219V Alteration und der Manifestation oder dem Verlauf der Colitis ulcerosa einen Zusammenhang gibt und zu bewerten, ob der besagte Polymorphismus eine Funktionsänderung des Reparaturproteins bewirkt.

Hierzu wurden 67 Colitis ulcerosa-Patienten und 40 gesunde Vergleichspersonen auf das Vorliegen des MLH1-I219V Polymorphismus hin untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe von bioinformatischen und biochemischen Methoden überprüft, ob die genetische Alteration tatsächlich zu einer Funktionsänderung des MLH1-Proteins führt. Hierzu wurde das veränderte MLH1-Protein parallel zum Wildtypprotein und einer Mutante mit bekanntem

Funktionsausfall in HEK293T-Zellen exprimiert und seine DNA-Reparaturaktivität mit Hilfe eines DNA-Mismatch-Reparatur-Assays untersucht.

Die bioinformatische Analyse der I219V-Alteration ergab keinen Anhaltspunkt für einen schwerwiegenden Defekt dieser Variante. Auch ließ sich keine Einschränkung der Reparaturaktivität *in vitro* feststellen. Die Alteration trat darüber hinaus nicht signifikant erhöht in verschiedenen Patientenuntergruppen auf.

Es ist somit unwahrscheinlich, dass der besagte Polymorphismus über eine fehlerhafte Mismatch-Reparatur mit der Manifestation einer Colitis ulcerosa zusammenhängt. Auch das vermeintliche Kopplungsungleichgewicht mit dem eigentlichen verantwortlichen Gen im IBD9-Locus scheint, wenn überhaupt, sehr schwach ausgeprägt zu sein.

# 1. Summary

Inflammatory bowel diseases (IBDs) comprise two major disorders: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Even if the detailed pathogenesis and the etiology of IBDs remain incompletely understood, a number of predisposing factors have been identified. Among these genetical factors, environmental influence, infectious and immunological mechanisms are of importance. Familial clustering of ulcerative colitis and Crohn's disease, and the increased concordance rate in monozygotic twins, strongly implicate genetic susceptibility in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Genetic linkage studies and genome-wide screens have identified nine susceptibility regions (IBD1-IBD9) on 12 different human chromosomes, involved in genetic predisposition to IBDs. The IBD9 locus is located on chromosome 3p and contains several candidate genes including the DNA mismatch repair gene *MLH1*. Inactivation of this gene causes a genetic instability called microsatellite instability which is the characteristic hallmark of an impaired DNA mismatch repair system. This microsatellite instability is frequently found in the mucosa of IBD patients. A common germ line alteration of *MLH1* (655A>G) results in the amino acid exchange MLH1 I219V. Conflicting data exist on its effect on the function of the protein, and it has recently been reported by Italian investigators to cosegregate with a refractory form of ulcerative colitis, suggesting that this alteration may impair mismatch repair activity and thereby contribute to certain forms of ulcerative Colitis.

The aim of the present was to clarify the role of MLH1 I219V alteration in mismatch repair activity and in the etiology of ulcerative colitis

We evaluated the frequency of the polymorphism in 67 UC patients in comparison to 40 healthy individuals. Additionally, we have analyzed the MLH1 I219V alteration using *in silico*, bioinformatical and biochemical analyses to evaluate a possible impairment of protein function. By site-directed mutagenesis we generated a pcDNA3 expression vector which contains the MLH1 I219V polymorphism and transfected it into HEK293T cells. In parallel experiments, both MLH1 wild type and repair-deficient mutant were transfected. The mismatch repair activity of the proteins was subsequently assessed by an *in vitro* mismatch repair assay.

There were no significant differences in genotype frequencies of UC patients and healthy volunteers. The bioinformatical analyses showed that I219 is a conserved, buried and

hydrophobic amino acid. That is the most frequently found residue on position 219, but valine also occurs often. Therefore, it is very unlikely that I219V abolishes MLH1 function but it may modulate it. However, quantitative biochemical evaluation showed identical repair activity of MLH1 I219V compared with the MLH1 wild type.

Following our results the MLH1 I219V alteration does not directly contribute to the etiology of ulcerative colitis through an impairment of mismatch repair. A putative linkage disequilibrium of MLH1 I219V with the causative gene of IBD9 locus is more distant than previously reported.

## 2. Einleitung

### 2.1 Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind in Schüben verlaufende destruierende Entzündungen des Intestinaltraktes. Zu ihnen gehören der Morbus Crohn, der nach seinem Erstbeschreiber Burrbill B. Crohn benannt ist, die Colitis ulcerosa und die nicht klassifizierbare Colitis indeterminata. Ätiologie und Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind trotz intensiver Forschung der vergangenen Jahrzehnte auch weiterhin nicht vollständig aufgeklärt.

Morbus Crohn und Colitis ulcerosa unterscheiden sich in ihrer Lokalisation und in ihrem makroskopischen sowie histologischen Erscheinungsbild voneinander. Der Morbus Crohn tritt diskontinuierlich segmental in allen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (von der Mundhöhle bis zum Anus) auf und befällt alle Wandschichten. Die Colitis ulcerosa hingegen beginnt im Rektum und kann sich von hier aus kontinuierlich unterschiedlich weit nach proximal ausdehnen. Im Gegensatz zum Morbus Crohn beschränkt sich das entzündliche Geschehen lediglich auf die Kolonmukosa. Leitsymptome beider Erkrankungen sind rezidivierende Diarrhoen, intestinale Blutungen und kolikartige Bauchschmerzen, gegebenenfalls mit extraintestinalen Manifestationen. Extraintestinale Manifestationen treten sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Colitis ulcerosa in verschiedenen Organsystemen auf und betreffen überwiegend Haut, Gelenke, Augen und die Gallenwege (Rothfuss *et al.*, 2006). Andere Organe sind seltener betroffen. Die Symptome können als Initialsymptome auftreten, vor allem die Gelenkbeschwerden (z.B. Polyarthritis, Monoarthritis, Sakroilitis) und das Erythema nodosum und können dadurch den Verdacht auf das Vorliegen einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung lenken. Orale Läsionen, Gallensteine, Pankreatitis, Nephrolithiasis und Amyloidose findet man häufiger bei Morbus Crohn als bei Colitis ulcerosa, wohingegen andere Symptome wie z.B. Manifestation an Haut und Augen bei beiden Krankheitsentitäten gleich häufig auftreten (Mendoza *et al.*, 2005; Rothfuss *et al.*, 2006). Angaben über die Häufigkeit des Vorkommens extraintestinaler Manifestationen bei Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung schwanken in der Literatur zwischen 6%-47% (Bernstein, 2001; Ricart *et al.*, 2004; Mendoza *et al.*, 2005).

Insgesamt ist das Risiko der Karzinomentwicklung bei Patienten mit länger bestehender chronisch entzündlicher Darmerkrankung gegenüber der Normalbevölkerung stark erhöht. Bei der Colitis ulcerosa ist vor allem bei einem ausgedehnten Kolonbefall, einem Krankheitsbeginn im Kindes- bzw. Jugendalter sowie nach langjähriger Krankheitsdauer mit einem erhöhten Karzinomrisiko bei 5,5%-13,5% der Patienten zu rechnen. Beim Morbus Crohn ist das Risiko einer Karzinomentwicklung mit 0,4%-0,8% wesentlich geringer (Pohl *et al.*, 2000).

### **2.1.1 Diagnose**

Die Diagnostik der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen basiert auf einer Zusammenschau von klinischen, bildgebenden (insbesondere endoskopischen) und histologischen Untersuchungen (Herfarth, 2002; Herrlinger & Stange, 2004).

Klinische Untersuchungen der Patienten und eine umfangreiche Anamnese sind von Bedeutung, um erste Hinweise zu Lokalisation und Schweregrad der Erkrankung zu gewinnen. Zur genaueren Untersuchung des Befallsmusters, der Entzündungsaktivität und zur Unterscheidung zwischen einem Morbus Crohn und einer Colitis ulcerosa sollte eine ausführliche Endoskopie durchgeführt werden (Herfarth, 2002). Dabei ist gerade bei Erstdiagnose eine komplette Ileokoloskopie ratsam. Bei Verdacht auf einen Morbus Crohn kann zusätzlich eine Gastroskopie erwogen werden. Während der endoskopischen Untersuchung besteht die Möglichkeit, multiple Schleimhautbiopsien zur anschließenden histologischen Sicherung der Diagnose zu entnehmen. Gerade bei langjährigem Verlauf der Erkrankung ist es zur Karzinomprophylaxe sinnvoll, alle 1-2 Jahre unabhängig von der Krankheitsaktivität eine Koloskopie durchzuführen. Zur Dünndarmdiagnostik hat sich vor allem die Kontrastmitteluntersuchung nach Sellink bewährt. Alternativ kann ein erfahrener Untersucher auch auf die Magnetresonanztomographie mit Enteroklysma zurückgreifen (Herfarth, 2002), die im Gegensatz zur Kontrastmitteluntersuchung ohne Strahlenbelastung auskommt. Die Ultraschalldiagnostik spielt sowohl im akuten Schub als auch zur Verlaufskontrolle eine wichtige Rolle. Neben einer verdickten Darmwand ist es dem erfahrenen Untersucher möglich, eventuell vorhandene Abszesse nicht-invasiv zu detektieren. Desweiteren kann die laborchemische Bestimmung von Entzündungsparametern (BSG, CRP, Thrombozytose, Anämiezeichen) Hinweise auf die Aktivität des entzündlichen Prozesses geben.

Während in den meisten Fällen mit Hilfe der oben genannten Untersuchungsmethoden eine Zuordnung zu Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa möglich ist, bleibt dies bei 9-20% der Fälle schwierig und die Klassifizierung erfolgt als sogenannte Colitis indeterminata (Rudolph *et al.*, 2002; Wells *et al.*, 1991). Das Konzept der Colitis indeterminata wurde 1978 von Price entwickelt, der in Operationspräparaten aus Kolonresektionen sowohl Merkmale eines Morbus Crohn als auch einer Colitis ulcerosa entdeckte (Price, 1978).

Die Bestimmung spezifischer Antikörper im Serum kann zur Differenzierung der beiden Krankheitsentitäten Colitis ulcerosa und Morbus Crohn in Einzelfällen eine wertvolle Hilfestellung leisten. Während sich bei der Diagnostik des Morbus Crohn Antikörper gegen *Saccaromyces cerevisiae* (ASCA) als hilfreich erwiesen haben, spielen bei der Colitis ulcerosa perinukleäre anti-neutrophile zytoplasmatische Antikörper (pANCA) eine Rolle (Duerr *et al.*, 1991; Sendid *et al.*, 1996). Bei der kombinierten Verwendung beider Antikörper ist eine Spezifität von bis zu 97% zu erreichen (Peeters *et al.*, 2001). Der Nachweis von pANCA-Antikörpern bei fehlenden ASCA-Antikörpern im Serum spricht mit 97%iger Spezifität für die Diagnose einer Colitis ulcerosa. Ein positiver ASCA-Wert bei negativem pANCA Nachweis zeigt mit 97%iger Spezifität die Diagnose eines Morbus Crohn an (Quinton *et al.*, 1998). Die niedrige Sensitivität beider Antikörper macht sie als Screeningmarker allerdings unbrauchbar.

## **2.2 Colitis ulcerosa**

### **2.2.1 Klinik und Pathologie**

Bei der Colitis ulcerosa handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung der kolorektalen Schleimhaut, die fast immer im Rektum beginnt und sich von hier aus kontinuierlich unterschiedlich weit nach proximal ausdehnen kann. Bei etwa der Hälfte der Patienten (ca. 54%) bleibt das Entzündungsgeschehen auf das Rektosigmoid beschränkt. In 28% der Fälle schreitet die Entzündung bis zur linken Flexur fort (linkseitige Colitis). Ein Befall des gesamten Kolons (Pancolitis) findet man bei 18% der Colitis ulcerosa-Patienten. Schreitet der Entzündungsprozess bis in das terminale Ileum vor, spricht man von einer „Backwash Ileitis“, die bei 10-20% der Patienten mit einer Pancolitis beobachtet wird (Abdelrazeq *et al.*, 2005).

In den meisten Fällen (85%) zeigt die Erkrankung einen chronisch rezidivierenden Verlauf, bei welchem akute Schübe im Wechsel mit symptomfreien Intervallen unterschiedlicher Länge vorkommen. Etwa 10% der Colitis ulcerosa-Patienten leiden an einer chronisch kontinuierlichen Verlaufsform mit unverändert anhaltender Aktivität ohne Remission. Lediglich 5% der Patienten haben einen akut fulminanten Verlauf, der mit einem plötzlichen Krankheitsbeginn, hohem Fieber, Tenesmen und Hämorrhagien einhergeht.

Die Colitis ulcerosa beginnt oft schleichend mit Durchfall und blutig-schleimigen Blutbeimengungen, kann aber auch einen subakuten oder akuten Verlauf nehmen. Die Ausprägung der Symptomatik ist von der Schwere und Ausdehnung der Erkrankung abhängig. In leichteren Fällen, in denen sich das entzündliche Geschehen meist lediglich auf das Rektum beschränkt, stehen häufig kleinvolumige Stuhlentleerungen mit Blut- und Schleimbeimengungen im Vordergrund. Bei ausgedehntem Befall des Kolons leiden die Patienten meist unter wässrig-schleimigen blutigen Durchfällen mit kolikartigen Bauchschmerzen (Tenesmen), welche in der Regel nach der Defäkation nachlassen. Massiv erhöhte Stuhlfrequenzen von bis zu 30 Stuhlentleerungen pro Tag können bei schweren Krankheitsverläufen vorkommen. Weitere unspezifische Symptome sind Fieber, Abdominalschmerzen, allgemeine Ermüdbarkeit und Gewichtsabnahme.

Extraintestinale Symptome wie Arthralgien, Ophthalmopathien mit Uveitis oder Iridozyklitis, dermatologische Manifestationen wie z.B. Erythema nodosum oder Pyoderma gangränosum und eine Leberbeteiligung mit dem Auftreten einer primär sklerosierenden Cholangitis können bei einem Teil der Patienten mit Colitis ulcerosa beobachtet werden (Danese *et al.*, 2005).

Die Colitis lässt sich pathologisch in ein frisches und in ein chronisch-fortgeschrittenes Stadium mit charakteristischen, aber nicht spezifischen makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen einteilen. Im frischen Stadium ist eine entzündlich gerötete, ödematöse Schleimhaut erkennbar, die bei Kontakt blutet. Mit zunehmender ödematöser Schleimhautschwellung kommt es zum Verlust der normalen Gefäßzeichnung. Es finden sich kleine Ulcerationen der Schleimhaut mit Fibrinbelägen, die im weiteren Krankheitsverlauf in ihrer Größe zunehmen, konfluieren und sich über das gesamte Darmlumen ausdehnen können. Histologisch imponieren in der floriden Entzündung sog. Kryptenabszesse, welche in Folge einer Granulozyteninfiltration der Schleimhaut mit Anhäufung von Granulozyten in den Krypten entstehen. Das Entzündungsgeschehen bleibt in der Regel auf die Mucosa beschränkt, selten ist auch die Submucosa entzündlich infiltriert. Bei mikroskopischer

Betrachtung der betroffenen Kolonabschnitte lässt sich eine Reduktion der Becherzellen erkennen.

Im chronisch-fortgeschrittenen Stadium kommt es durch rezidivierende Ulcerationen zu einer Zerstörung der Schleimhaut mit Verlust des normalen Faltenreliefs. Kleinere, stehen gebliebene Schleimhautareale, die zwischen den ausgedehnten Ulcerationen herausragen, imponieren als sog. Pseudopolypen. Bei ausgeprägten Befunden kommt es zum Verlust der typischen Dickdarmhaustrierung, was sich radiologisch im sog. Fahrradschlauchphänomen widerspiegelt. Histologisch stehen bei länger bestehender chronischer Entzündung des Kolons eine Schleimhautatrophie sowie Lymphozyten- und Histiozyteninfiltration der Schleimhaut im Vordergrund. Bei langjährigem Krankheitsverlauf kann es zum Auftreten von Epitheldysplasien mit karzinomatöser Entartung kommen (Danese *et al.*, 2005; Suzuki, 2005). Häufige Komplikationen der Colitis ulcerosa sind ein massiver Blutverlust aus erosiv ulcerativen Schleimhautveränderungen sowie ein starker Gewichtsverlust infolge einer verminderten Nahrungsaufnahme wegen abdomineller Beschwerden der Patienten. Bei wenigen Colitis ulcerosa-Patienten tritt als gefürchtete Komplikation ein toxisches Megakolon auf (Bortlik & Lukas, 2001). Es entsteht in Folge einer schweren transmuralen Entzündung, die durch Veränderung der Muskelschicht und des Plexus mesentericus zu einer Paralyse der glatten Muskelfasern führt. An Symptomen finden sich ein aufgetriebenes Abdomen, spärliche, hochgestellte oder fehlende Darmgeräusche, Fieber über 38,5 °C, eine Tachykardie mit einer Herzfrequenz von über 120/min, eine Leukozytose sowie Elektrolytentgleisung und eine Hypalbuminämie.

Diagnostisch wegweisend ist neben dem Nachweis der oben genannten Symptome eine radiologische Darstellung eines massiv dilatierten Kolons mit einem Lumendurchmesser von über 6 cm und einer fehlenden Haustrierung (Ruf, 2006). Durch die massive Überblähung des Darms kann es zur Perforation mit anschließender Peritonitis kommen, die in unter Umständen letal endet (Greenstein & Aufses, Jr., 1985).

Bei einem Teil der Patienten entstehen nach langjährigem Krankheitsverlauf kolorektale Karzinome, die sich meist auf dem Boden einer Epitheldysplasie entwickelten. Eine langjährige Krankheitsdauer, ein ausgedehnter Kolonbefall, das Vorliegen einer primär sklerosierenden Cholangitis sowie eine positive Familienanamnese bezüglich des Auftretens kolorektaler Karzinome stellen wichtige Risikofaktoren dar (Hagymasi & Tulassay, 2006)

### 2.2.2 Therapie

Die Therapie der Colitis ulcerosa richtet sich nach Schweregrad, Verlauf und Ausdehnung der Erkrankung. Eine kausale Therapie ist mit den derzeit verfügbaren Medikamenten nicht möglich. Ziel der medikamentösen Behandlung ist es, die Symptome eines akuten Schubs zu lindern und die Remission anschließend zu erhalten. Zur Remissionsinduktion kommen in Abhängigkeit von Schwere und Ausdehnung der Erkrankung 5-Aminosalicylsäurepräparate oder Steroide zum Einsatz. Leichte bis mittelschwere Verlaufsformen einer Colitis ulcerosa werden mit 5-Aminosäurepräparaten behandelt, wobei bei distalem Befall Rektalschaumpräparate, Klysmen oder Suppositorien lokal angewandt werden und bei ausgedehntem Befall systemisch behandelt wird. Schwere und fulminante Verläufe bedürfen in der Regel einer systemischen Steroidtherapie, je nach Schweregrad des Krankheitsbildes in oraler bzw. intravenöser Applikationsform. Bei knapp zwei Drittel der Patienten mit einer schweren oder fulminant verlaufenden Colitis ulcerosa erreicht man mit dieser Therapie eine Remission innerhalb einer Woche. Das rechtliche Drittel wird als steroidrefraktär eingestuft und bedarf einer immunsuppressiven Therapie mit Cyclosporin i.v. oder alternativ oral oder i.v. mit Tacrolimus. Seit 2006 ist zudem der anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab für die Therapie der mittel- bis schwergradigen Colitis ulcerosa zugelassen. Bei 80% der Colitis-Patienten kann durch eine Cyclosporindauerinfusion eine Remission erreicht werden (Lichtiger *et al.*, 1994). Anschließend sollte eine dauerhafte immunsuppressive Therapie mit Azathioprin erfolgen. Auch bei einer steroidabhängigen Colitis hat sich Azathioprin als Mittel der Wahl bewährt. Selbst bei unkomplizierten Verlaufsformen einer Colitis ulcerosa sollte eine remissionserhaltende Therapie durchgeführt werden (Sutherland *et al.*, 2000). Diese wird in der Regel mit 5-Aminosalicylsäurepräparaten oder Sulfasalazin über mindestens zwei Jahre durchgeführt. Es gibt Hinweise dafür, dass diese Therapie das Auftreten kolorektaler Karzinome verringert (Nielsen & Munck, 2007). Eine gleichwertige Therapiealternative bezüglich der Rezidivprophylaxe ist die Gabe des probiotischen apathogenen *E.coli* Stamms Nissle 1918 (Adam *et al.*, 2006).

Die Notwendigkeit einer operativen Therapie besteht bei fulminanten therapierefraktären Verläufen mit toxischem Megacolon, Perforation oder unstillbaren Blutungen. Weitere Indikationen sind neben chronisch aktiven steroidrefraktären oder steroidabhängigen Erkrankungen das Auftreten von Epitheldysplasien mit der Gefahr der karzinomatösen Entartung. Das operative Verfahren der Wahl ist die totale, kontinenzerhaltende Proktokolektomie mit Anlage eines ileo-analen Pouches. Nachteil dieses Verfahrens ist die

mögliche postoperative Entstehung einer Pouchitis, die immerhin bei mehr als der Hälfte der Patienten beobachtet wird (Stahlberg *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1998).

### **2.2.3 Epidemiologie**

Die Inzidenz der Colitis ulcerosa schwankt weltweit in Abhängigkeit der geographischen Lage zwischen 0,5-24,5 pro 100000 Einwohner (Lakatos, 2006). Insgesamt lässt sich bezüglich des Auftretens der Erkrankung ein deutliches Nord-Süd-Gefälle und ein geringeres West-Ost-Gefälle erkennen. Die höchsten Inzidenzraten sind dabei in Nord- und Westeuropa sowie in Nordamerika zu verzeichnen. Deutlich seltener ist die Inzidenz der Erkrankung in Afrika, Südamerika und Asien einschließlich China (Lakatos, 2006; Xia *et al.*, 1998). Die Inzidenz für Japan wird mit 1,95/10000 Einwohner angegeben und liegt somit weit unter dem europäischen Durchschnitt. In einigen Studien konnte in den vergangenen Jahren eine veränderte Entwicklung der Inzidenzraten gezeigt werden. Hierbei zeigen Länder mit niedrigen Inzidenzraten einen enormen Anstieg, wohin gegen das jährliche Auftreten von Neuerkrankungen in Gebieten mit hoher Inzidenz nur noch leicht anstieg bzw. sank (Lakatos, 2006). Während die jährliche Zahl der Neuerkrankungen z.B. in Osteuropa, Kroatien, Asien und Japan in den vergangenen Jahren stark angestiegen ist, sank die Inzidenzrate z.B. in Nordfrankreich von 4,2/100000 auf 3,5/100000. Für die Inzidenzraten in Westeuropa und Skandinavien konnten in den vergangenen 20 Jahren hingegen keine Veränderungen festgestellt werden (Lakatos, 2006; Lukas *et al.*, 2006). Es wird vermutet, dass unter anderem Umweltfaktoren für diese Entwicklung eine wichtige Rolle spielen. Die Prävalenz der Colitis ulcerosa liegt zwischen 30 und 200 pro 100000 Einwohner.

In Europa liegt die durchschnittliche Rate an Neuerkrankungen bei 10,4 pro 100000 Einwohner pro Jahr (11,8 im Norden gegenüber 8,7 pro 100000 im Süden). Dabei weist Island die höchste und Südportugal die niedrigste Inzidenzrate auf (Lakatos, 2006). In Deutschland liegt die jährliche Inzidenz bei 3-9 Fällen pro 100000 Einwohner. Die Prävalenz beträgt 40-80/100000 Einwohner.

Neben der geographischen Lage spielen auch ethnische Unterschiede bezüglich der Inzidenzrate der Colitis ulcerosa eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass weiße Bevölkerungsgruppen, insbesondere Juden, häufiger erkranken als farbige. (Roth *et al.*, 1989). Prinzipiell kann sich eine Colitis ulcerosa in allen Altersstufen manifestieren, wobei der durchschnittliche Altersgipfel für die Erkrankung zwischen 20 und 34 Jahren liegt

(Shivananda *et al.*, 1996). Die Angaben zur Geschlechtsverteilung der Colitis ulcerosa sind in der Literatur sehr variabel. Männer scheinen geringfügig häufiger an der Erkrankung zu leiden als Frauen (Xia *et al.*, 1998).

## **2.2.4 Ätiologie und Pathogenese**

Trotz intensiver Forschung während der vergangenen Jahre bleiben Ätiologie und Pathogenese der Colitis ulcerosa bislang noch weitgehend ungeklärt. Neben genetischen Faktoren werden Umwelteinflüsse, infektiöse Ursachen und immunologische Fehlregulationen diskutiert. Neuere Vorstellungen zur Pathogenese der Colitis ulcerosa wie auch des Morbus Crohns gehen von einer überschießenden oder vermindert supprimierten Immunantwort gegenüber eines unbekanntem Antigen aus (Lukas *et al.*, 2006). Bei diesem unbekanntem Antigen könnte es sich beispielsweise um einen Nahrungsbestandteil, ein infektiöses Agens oder um ein Antigen der natürlich vorkommenden mikrobiellen Darmflora handeln. Das krankheitsauslösende Antigen wird durch in der Darmwand vorhandene antigenpräsentierende Zellen speziellen immunologischen Abwehrzellen (T-Zellen) präsentiert. Die dadurch überschießend aktivierten T-Zellen bilden proinflammatorische Zytokine, die ihrerseits durch die Freisetzung sekundärer Entzündungsmediatoren letztendlich zur Zerstörung der Darmschleimhaut führen. Durch den inflammatorisch bedingten Verlust der mukosalen Barrierefunktion kommt es zu einem vermehrten Eindringen von Antigenen und dadurch zur chronischen Unterhaltung bzw. Aggravation des entzündlichen Prozesses.

Dieses immunologische Konzept, welchem gerade in der vergangenen Jahre viel Aufmerksamkeit gewidmet wurde, kann allerdings nicht unabhängig von genetischen Faktoren sowie den jeweiligen Umweltfaktoren, denen das Individuum ausgesetzt ist, betrachtet werden (Schmidt & Stallmach, 2005).

### **2.4.4.1 Genetischer Hintergrund**

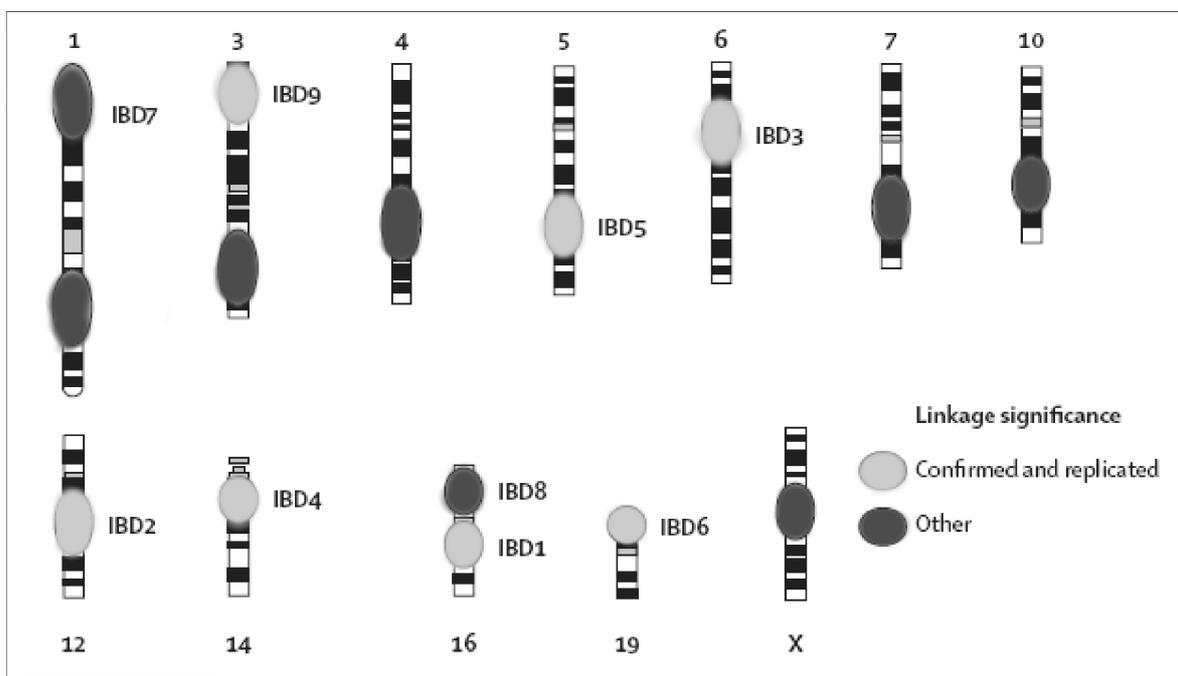
Ein Hinweis auf einen genetischen Hintergrund der Colitis ulcerosa ergibt sich aus zahlreichen Untersuchungen der Inzidenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bei Juden und Nicht-Juden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Juden eine höhere Inzidenzrate aufweisen als nicht-jüdische Populationen (Yang *et al.*, 1993; Roth *et al.*, 1989).

Ein Vergleich bezüglich der Inzidenzraten von weißen gegenüber nicht-weißen Bevölkerungsgruppen zeigt ein geringeres Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bei nicht-weißen Populationen, insbesondere bei solchen aus unterentwickelten Ländern (Schmidt & Stallmach, 2005). Allerdings sind bei hispanischen und afroamerikanischen Amerikanern steigende Inzidenzraten zu verzeichnen, wenn sie aus urbanen Gebieten stammen, was wiederum auf Umwelteinflüsse hinweist (Calkins *et al.*, 1984).

Auch die immer wieder dokumentierte familiäre Häufung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (bei ca. 10% der Patienten) stützt die Annahme des genetischen Einflusses. Geschwisterkinder betroffener Personen tragen ein erhöhtes genetisches Risiko, an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken (Satsangi *et al.*, 1998). Das relative Risiko für Verwandte ersten Grades von Indexpatienten, ebenfalls zu erkranken, liegt beim 14-15 fachen des Populationsrisikos (Satsangi *et al.*, 1994). Dabei konnte besonders bei Familien von Patienten mit früher Erstmanifestation der Erkrankung eine erhöhte Prävalenzrate festgestellt werden (Polito *et al.*, 1996). Untersuchungen von Familien, bei welchen mehrere Mitglieder betroffen sind, zeigen, dass spezifische klinische Krankheitscharakteristika wie Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung oder das Auftreten extraintestinaler Manifestationen überzufällig häufig konkordant sind (Satsangi *et al.*, 1996a). Desweiteren findet sich in Familien mit Betroffenen in mehren Generationen eine Verschiebung des Manifestationsalter in Richtung eines früheren Auftretens. Dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet und deutet auf eine polygene Ursache der Erkrankung hin. Diese Annahme wird auch durch den molekularen Nachweis multipler Kopplungsregionen gestützt.

Weitere wertvolle Hinweise auf eine genetische Grundlage der Erkrankung liefern Zwillingsstudien. In drei großen Studien aus Schweden, Dänemark und Großbritannien konnten für das Auftreten chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen insgesamt Konkordanzraten von 36% bei monozygoten gegenüber lediglich 4% bei dizygoten Zwillingspaaren nachgewiesen werden (Gaya *et al.*, 2006). Im Falle der Colitis ulcerosa lagen die Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen zwischen 6,2% und 18,2% und die der monozygoten zwischen 0% und 4,5%. Beim Morbus Crohn konnte bei monozygoten Zwillingspaaren eine Konkordanzrate von 58,3 % gezeigt werden (Tysk *et al.*, 1988; Orholm *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 1996a; Thompson *et al.*, 1996b). Die höhere Konkordanz bei Zwillingen mit Morbus Crohn verglichen mit Zwillingspaaren, die an Colitis ulcerosa leiden, lassen ein größeres Gewicht des genetischen Einflusses bei Morbus Crohn vermuten.

Neben sog. Suszeptibilitätsgenen, die die individuelle genetische Prädisposition für die Entwicklung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung bedingen, sind auch Gene, die den klinischen Phänotyp prägen, für die Krankheitsmanifestation von Bedeutung (Gaya *et al.*, 2006). In zahlreichen genomweiten Untersuchungen und Kopplungsanalysen der vergangenen Jahre konnten, wie Abbildung 1 gezeigt, neun Suszeptibilitätsregionen (IBD1-IBD9) für chronisch entzündliche Darmerkrankungen auf insgesamt 12 Chromosomen nachgewiesen werden (Ahmad *et al.*, 2004; Gaya *et al.*, 2006)



**Abbildung 1** Suszeptibilitätsregionen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (Quelle: Gaya et al)

Einer der bestuntersuchten Genloci ist der IBD1-Locus in der Perizentromerregion auf Chromosom 16, der das Suszeptibilitätsgen *NOD2/CARD15* enthält, und in hohem Maße mit dem Auftreten des Morbus Crohn, nicht aber der Colitis ulcerosa assoziiert ist. (Silverberg, 2005b; Hugot *et al.*, 1996; Silverberg, 2005a; Hugot *et al.*, 2001). IBD2 auf Chromosom 12q13 hingegen zeigt eine deutlichere Assoziation mit der Colitis ulcerosa (Hampe *et al.*, 1999; Parkes *et al.*, 2000). Daneben gibt es einige Regionen die mit beiden Erkrankungen in Verbindung gebracht werden, wie z.B. der IBD3-Locus, der auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21) gelegen ist und Gene des *MHC*-Komplexes sowie das *TNF $\alpha$* -Gen enthält (Hampe *et al.*, 1999). IBD4 befindet sich auf Chromosom 14q11 und enthält den *TCR- $\alpha/\delta$* -Komplex (Duerr *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 1999). IBD5 auf Chromosom 5q31-33 enthält die

Kandidatengene *IL3*, *IL4*, *IL5*, *IL13* und das *CSF2*-Gen (Rioux *et al.*, 2000). Für beide Loci konnte lediglich eine Assoziation mit dem Morbus Crohn gezeigt werden. Der IBD9-Locus liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 und enthält die Kandidatengene *HGFR*, *EGFR*, *GNAI2* sowie das Mismatch-Reparaturgen *MLH1*. Seine Assoziation mit dem Auftreten chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wurde zunächst durch genomweite Untersuchungen aufgedeckt (Satsangi *et al.*, 1996b) und konnte anschließend in weiteren Studien bestätigt werden (Hampe *et al.*, 2001; Duerr *et al.*, 2002). Auch wenn die Gene, die mit dem Entstehen der Erkrankung assoziiert sind, noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten, ist es bereits gelungen, andere Gene sicher auszuschließen.

Zahlreiche weitere Gene konnten mit dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in Verbindung gebracht werden. So z.B. das *ICAM-1*-Gen, der Komplementfaktor 3, der Thromboxan-A2-Rezeptor oder die Leukotrien-B4-Hydroxylase auf Chromosom 19p13 (IBD6) (Rioux *et al.*, 2000).

#### **2.2.4.2 Umwelteinflüsse**

Schon die Tatsache, dass eine Colitis ulcerosa bei 85% der Patienten sporadisch, also ohne jegliche familiäre Häufung, auftritt, deutet auf das Mitwirken von Umweltfaktoren bei der Krankheitsentstehung hin. Außerdem konnte das Auftreten chronisch-entzündlicher Erkrankungen mit dem Lebensstil westlicher Industrieländer in Verbindung gebracht werden. Einen klaren Hinweis dafür liefern die steigenden Inzidenzraten nach dem 2. Weltkrieg in westeuropäischen Bevölkerungsgruppen gegenüber dem verzögerten Anstieg in südeuropäischen Ländern (Loftus, Jr. & Sandborn, 2002). Ein weiterer Umstand, der auf den Einfluss des Zivilisationsfaktors aufmerksam macht, ist, dass Populationen, die von einem Niedrigrisiko-Umfeld in ein Hochrisiko-Umfeld eingewandert sind, mit der Zeit das Risikoprofil des Hochrisikogebietes aufzeigen (Lakatos, 2006).

Ein klarer Bezug zur Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen konnte für das Rauchen und die Appendektomie nachgewiesen werden.

Während in zahlreichen Studien der Nikotingenuß als zusätzlicher Risikofaktor für die Manifestation und den Verlauf des Morbus Crohns gezeigt werden konnte, scheinen bei der Colitis ulcerosa protektive Effekte zu überwiegen (Calkins, 1989). Das relative Risiko von Nichtrauchern gegenüber Rauchern, eine Colitis ulcerosa zu entwickeln, liegt in etwa bei 2,4. Im Gegensatz dazu konnte für ehemalige Raucher ein 1,7fach erhöhtes Erkrankungsrisiko verglichen mit Patienten, die nie geraucht haben, festgestellt werden (Schmidt & Stallmach,

2005). Rauchen verbessert den Verlauf einer Colitis ulcerosa, vermindert die erforderliche Dosis an Steroiden und führt insgesamt zu einer sinkenden Kolektomierate. Gründe für diesen positiven Effekt sind vermutlich die steigende Muzinsynthese, die verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine, der reduzierte Muskeltonus der glatten Darmmuskulatur, sowie eine veränderte Permeabilität für Makromoleküle (Lukas *et al.*, 2006).

Ähnliche Unterschiede konnten für die Appendektomie gezeigt werden. Andersson *et al.* wiesen in einer großen Kohortenstudie nach, dass das Risiko bei appendektomierten Personen, eine Colitis ulcerosa zu entwickeln, vermindert ist, vorausgesetzt die Operation wurde aufgrund einer Entzündung (Appendizitis, Lymphadenitis) und vor dem 20. Lebensjahr durchgeführt. Viele weitere Umweltfaktoren, wie das Einnehmen oraler Kontrazeptiva oder der Verzehr bestimmter Nahrungsmittel, sind in der Vergangenheit diskutiert worden, allerdings mit unterschiedlichen Ergebnissen. Godet *et al.* konnten einen leichten Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung und der Einnahme der Antibabypille nachweisen (Godet *et al.*, 1995). Allerdings konnte dieses Ergebnis in einigen anderen Studien nicht bestätigt werden, so dass der Effekt oraler Kontrazeptiva letztendlich ungeklärt bleibt. Auch der Effekt von Nahrungsmittel auf die Krankheitsentstehung und den Krankheitsverlauf bleibt noch ungeklärt. Man hat herausgefunden, dass ein hoher Verzehr an Milchprodukten oder ein niedriger Verzehr an Ballaststoffen mit einem vermehrten Auftreten einer Colitis ulcerosa assoziiert ist (Fernandez-Banares *et al.*, 1999). Daneben wurde der Verzehr raffinierter Kohlenhydrate in einen kausalen Zusammenhang mit der Entstehung der Erkrankung gebracht. Man geht davon aus, dass die Essgewohnheiten des „modernen Lebens“, wie beispielsweise Coca-Cola oder Schokolade, die in den letzten Jahren ansteigenden Inzidenzraten chronisch-entzündlicher Darmerkrankung begünstigen könnte (Russel *et al.*, 1998).

Andere Marker für den „modernen Lebensstil“ westlicher Industrienationen sind Hygiene und Familiengröße. Auch hier konnte ein klarer Bezug zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen festgestellt werden: Kinder, die in einer extrem sauberen Umgebung aufwachsen, tragen ein höheres Risiko, an einer Colitis ulcerosa zu erkranken (Lukas *et al.*, 2006). Man geht davon aus, dass insbesondere kleine Familien einen erheblich höheren Standard in ihrer Kinderhygiene pflegen können, so dass gerade Kinder aus diesen Familien ein höheres Risiko tragen eine chronisch-entzündlichen Darmerkrankung zu entwickeln.

### **2.2.4.3 Psychische Faktoren**

Der Zusammenhang zwischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und psychosozialen Faktoren wurde in der Vergangenheit intensiv untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, deren Erkrankung sich in Remission befindet, ein erheblich höheres Risiko für einen erneuten Schub haben, wenn sie an einer schweren Depression leiden (Mittermaier *et al.*, 2004). Diese Erkenntnisse konnten auch durch zahlreiche weitere prospektive Studien und klinische Untersuchungen bestätigt werden, die ganz allgemein negative „life events“ (z.B. Trauer, Depression oder Scheidung) mit der Verschlechterung einer bestehenden Erkrankung in Verbindung bringen (Bitton *et al.*, 2003; Mawdsley & Rampton, 2005). Während man früher davon ausging, dass chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zum Formenkreis psychosomatischer Erkrankungen gehören und man von typischen, prädisponierten Persönlichkeitsstrukturen bei den Patienten ausging, weiß man heutzutage, dass es keinen konsistenten psychopathologischen Typus gibt.

### **2.2.4.3 Infektiöse Faktoren**

Die klinische Ähnlichkeit chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen mit gastrointestinalen Infektionen veranlasste die Diskussion einer möglichen mikrobiellen Beteiligung bei der Krankheitsentstehung. Die Tatsache, dass sowohl die Colitis ulcerosa als auch der Morbus Crohn in den am stärksten keimbesiedelten Regionen (komplettes Kolon bzw. terminales Ileum) des Darms auftreten, stützt diese Annahme. Zudem konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass chronisch-entzündliche Erkrankungen nur in Gegenwart einer normalen mikrobiellen Flora, nicht aber unter keimfreien Bedingungen entstehen (Taurog *et al.*, 1994). Der therapeutische Benefit, der aus der Probiotikagabe (Rembacken *et al.*, 1999; Gionchetti *et al.*, 2003) bzw. einer Antibiotikatherapie resultiert, ist als indirekter Hinweis auf die Bedeutung der intestinalen Flora zu deuten. Eine mögliche ursächliche Beteiligung von Masern oder Mykobakterien wurde in der Vergangenheit mehrfach untersucht. Auch wenn es Studien gab, die einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Masern und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen konnten (Montgomery *et al.*, 1999), bleibt die kausale Rolle einzelner pathogener Keime in der Entwicklung der Erkrankung letztendlich ungeklärt.

#### **2.2.4.4 Immunologische Faktoren**

Zahlreiche Studien haben die Kenntnisse über eine immunologische Genese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen in den letzten Jahren verbessert. Grundsätzlich besteht die Problematik bei der Pathogenese der Colitis ulcerosa in einer überschießenden und zu langandauernden Aktivierung des darmassoziierten Immunsystems. Während ein Ungleichgewicht zugunsten von Th1-Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Morbus Crohn spielt, sind Th2-Zellen, die durch die Synthese von Zytokinen wie Interleukin (IL) –4, IL-5 und IL-13 gekennzeichnet sind, typisch für die Pathogenese der Colitis ulcerosa (Schmidt & Stallmach, 2005). Neben der Synthese von Antikörpern sind Th2-Zellen maßgeblich an der immunologischen Antwort auf verschiedene Allergene und Wurmerkrankungen beteiligt. Bei Colitis ulcerosa-Patienten lässt sich ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nachweisen. Durch die Fehlsteuerung der Immunreaktion kommt es zu überschießender Aktivierung proinflammatorischer Zytokine. Dies führt unter anderem zur Stimulierung IgG1-produzierender Plasmazellen, die im Gegensatz zu den normalerweise gebildeten IgA-Antikörpern zu einer Aktivierung der Komplementkaskade führen und somit zur Destruktion der Darmschleimhaut beitragen (Halstensen *et al.*, 1993).

Auch die Frage der Autoimmunität bezüglich Ätiologie und Pathogenese der Colitis ulcerosa wird immer wieder diskutiert. Interessanterweise konnten bei betroffenen Personen mehrere Autoantikörper identifiziert werden, die weder gewebespezifisch noch pathogenetisch bedeutsam zu sein scheinen. In der Darmschleimhaut und im Serum von 60-80% der Colitis ulcerosa-Patienten findet man IgG-Antikörper gegen unterschiedliche Antigene, wie z.B. pANCA oder Antikörper gegen Colonepithelantigene wie Tropomyosin (Geng *et al.*, 1998; Biancone *et al.*, 1995).

### **2.3 Die Postreplikative DNA-Mismatch-Reparatur (MMR)**

Während jeder Zellteilung müssen zwei identische Kopien des Genoms hergestellt und an die Tochterzelle weitergegeben werden. Um Veränderungen der Erbinformation zu vermeiden, muss die Replikation fehlerfrei ausgeführt werden. Hierfür bedient sich die Zelle DNA-Polymerasen mit integrierter „Korrekturlesefunktion“ (Proofreadingaktivität), die falsch

eingebaute Basen schon während des Replikationsvorgangs erkennen und beheben können. Zur weiteren Verbesserung der Replikationstreue verfügt die Zelle über eine weitere Korrekturinstanz: das „postreplikative Mismatch-Reparatur-System“. Die Hauptaufgabe der MMR besteht darin, Fehler, die der Proofreadingaktivität der Polymerase entgangen sind, postreplikativ zu erkennen und zu korrigieren und dadurch die ohnehin schon niedrige Fehlerrate (ein Fehler pro  $10^{10}$  Nukleotide) um den Faktor 100-1000 zu senken (Modrich & Lahue, 1996). Keimbahn-Defekte in der MMR bedingen ein erhöhtes Karzinomrisiko (Jiricny & Marra, 2003).

### 2.3.1 Wichtige Komponenten des MMR-Systems

Umfangreiche Untersuchungen des Ablaufs der MMR-Reaktion bei Prokaryonten haben zum Verständnis der wesentlich komplexer ablaufenden eukaryontischen MMR beigetragen. In menschlichen Zellen wird die Erkennung fehlerhaft gepaarter Basen prinzipiell durch zwei Homologe des *E.coli* MutS Proteins, hMutS $\alpha$  (ein Heterodimer aus hMSH2 und hMSH6) und hMutS $\beta$  (bestehend aus hMSH2 und MSH3) gewährleistet (Kunkel & Erie, 2005). hMutS $\alpha$  erkennt neben Basenfehlpaarungen auch sog. IDLs (insertion-deletion-loops) von bis zu vier ungepaarten Basenpaaren, die durch Verrutschen des neusynthetisierten Stranges gegen die Matrix entstehen. hMutS $\beta$  sorgt hingegen nur für die Reparatur größerer IDLs. IDLs mit mehr als zehn ungepaarten Basen können von der MMR nicht mehr repariert werden und benötigen somit andere Reparaturmechanismen (Littman *et al.*, 1999). hMutL $\alpha$ , ein Heterodimer bestehend aus den zwei bakteriellen MutL-Proteinhomologen hMLH1 und hPMS2, sorgt, nach der initialen Fehlererkennung durch hMutS, für den Verdau des fehlerhaften DNA-Strangs durch die *Exonuklease I*, die fehlerfreie Resynthese durch die *Polymerase  $\delta$*  und die anschließende Ligation der neusynthetisierten Nukleotidsequenz in den DNA-Strang (Kunkel & Erie, 2005). Neben hMLH1 und hPMS2 gehören auch hMLH3 und hPMS1 zu den MutL homologen Proteinen. Verbindet sich hMLH1 mit hPMS1 entsteht das Heterodimer hMutL $\beta$ . hMLH1 und MLH3 bilden zusammen das Heterodimer hMutL $\gamma$ . Obwohl gezeigt werden konnte, das hMutL $\beta$  an hMutS $\alpha$  binden kann, konnte *in vitro* keine MMR-Aktivität nachgewiesen werden (Raschle *et al.*, 1999). hMutL $\gamma$  zeigt zwar *in vitro* eine Beteiligung an der Reparatur von Basenfehlpaarungen und kleineren IDLs, allerdings scheint die Funktion *in vivo*, wenn überhaupt, nur marginal zu sein (Cannavo *et al.*, 2005).

### 2.3.2 Strangdiskriminierung

Um zu gewährleisten, dass nur der fehlerhafte, neusynthetisierte Tochterstrang und nicht der korrekte Mutterstrang repariert wird, müssen in der Zelle entsprechende Mechanismen zur Strangdiskriminierung vorhanden sein. In der prokaryontischen Reparatur wird diese Aufgaben durch die Endonuklease MutH wahrgenommen. Dieses Protein besitzt die Fähigkeit, so an hemimethylierte GATC-Sequenzen zu binden, dass der Endonuklease-Schnitt im nicht-methylierten Strang erfolgt (Welsh *et al.*, 1987). Die Tatsache, dass die Methylierung von GATC-Sequenzen erst kurz nach der Replikation erfolgt, identifiziert den nicht-methylierten-Strang als den neusynthetisierten. Da in eukaryontischen Zellen bislang kein MutH-homologes Protein identifiziert werden konnte und ebenso wenig ein mit der bakteriellen Methylierung vergleichbarer Prozess existiert, erfolgt die Strangdiskriminierung hier wahrscheinlich nach einem gänzlich anderen Mechanismus, der bislang noch weitgehend unverstanden bleibt.

### 2.3.3. Modelle zur Reparaturinitiation

Ähnlich ungeklärt bleibt derzeit auch die Frage, wie genau hMutS $\alpha$  (bzw. hMutS $\beta$ ) nach initialer Fehlererkennung Kontakt zur übrigen Reparaturmaschinerie herstellt. Untersuchungen haben ergeben, dass die Anwesenheit von ATP die Affinität von MutS-Proteinen zu DNA-Fehlern enorm schwächt und zur unmittelbaren Abdiffusion des Proteins vom Fehler führt (Blackwell *et al.*, 1998; Iaccarino *et al.*, 1998; Gradia *et al.*, 1997). Dadurch geht die Information über die genaue Lokalisation des Fehlers verloren, was absolut widersprüchlich zur eigentlichen Aufgabe des MutS, die Reparatur des zunächst gebundenen Fehlers auszulösen, zu sein scheint. Andererseits ist die Bereitschaft des MutS-Proteins, ATP aufzunehmen und zu hydrolysieren, besonders groß, nachdem es den Fehler bereits gebunden hat (Alani, 1996). In der Vergangenheit wurden mehrerer Modelle vorgeschlagen, die diesen scheinbaren Widerspruch zu erklären versuchen. Im „Translocation model“ (Allen *et al.*, 1997) und „Sliding clamp model“ (Gradia *et al.*, 1997) wird davon ausgegangen, dass MutS nach der Fehlererkennung entlang der DNA zur Endonuklease wandert, um diese über den aufgetretenen Fehler zu informieren und somit die Reparatur zu starten. In diesen Modellen erhält die Abdiffusion einen mechanistischen Zweck und wird zu einem essentiellen Bestandteil des Reparaturprozesses gemacht. Das „DNA binding model“ (Junop *et al.*, 2001)

bezweifelt die Bewegung von MutS entlang der DNA-Helix und postuliert, dass das Protein während der Initiation der Reparatur und Aktivierung der Endonuklease an den Fehler gebunden bleibt. Experimente zeigen, dass die Aktivierung der Reparaturkomponenten von MutS *in trans*, das heißt, von einem DNA-Molekül auf das andere. Ein Wandern entlang der DNA als mechanistische Notwendigkeit ist daher in Frage gestellt. Trotz intensiver Forschung ist der genaue Mechanismus der MMR Initiation zurzeit noch nicht genau verstanden.

### **2.3.4 Reparaturablauf**

Die prokaryontische und die eukaryontische Mismatch-Reparatur lässt sich *in vitro* durchführen. Hierbei wird ein Plasmid, welches eine Basenfehlpaarung enthält, mit MMR-Proteinen aus humanen Zellextrakten (bzw. bakteriellen MMR-Proteinen) inkubiert und der Reparatur Erfolg anschließend kontrolliert. Abbildung 2 zeigt ein vereinfachtes Schema des generellen MMR-Mechanismus in eukaryonten Zellen. Nachdem hMutS den Fehler erkannt und gebunden hat nimmt es Kontakt zum hMutL Dimer auf. Der entstandene MutS-MutL Komplex steuert nun den Verdau des fehlerhaften Stranges der DNA-Doppelhelix durch die Exonuklease I, welche auf den Abbau von einzelnen DNA-Strängen spezialisiert ist. Der verbleibende DNA-Einzelstrang, der die korrekte Erbinformation enthält, dient der DNA-Polymerase  $\delta$  als Matrize zur Resynthese einer korrekt gepaarten DNA-Doppelhelix. Eine derzeit noch nicht genau charakterisierte Ligase sorgt anschließend dafür, dass das neusynthetisierte DNA-Teilstück in den übrigen DNA-Strang integriert wird.

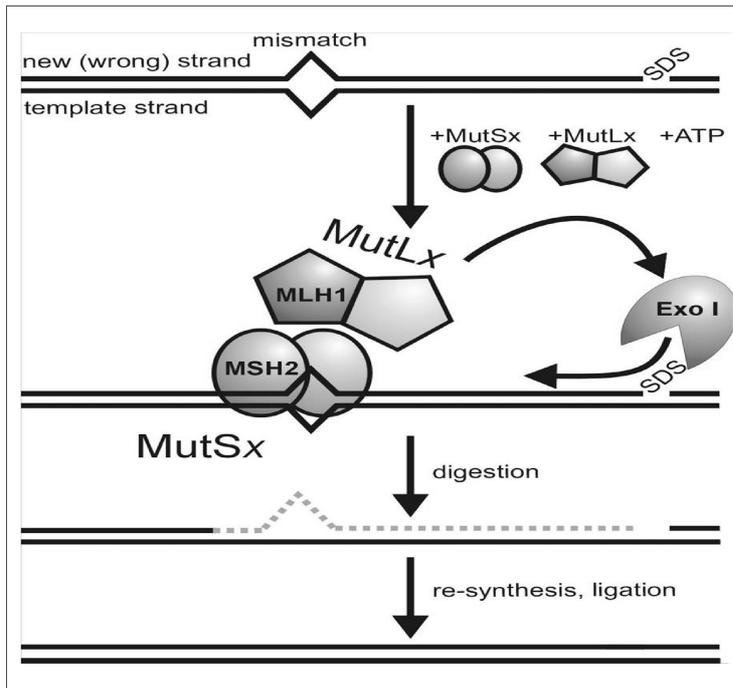


Abbildung 2 Mismatch-Reparatur

Weiterhin deuten die Ergebnisse neuere Studien darauf hin, dass auch das Single Strand DNA Binding Protein RPA (Ramilo *et al.*, 2002) und das Proliferating Cellular Nuclear Antigen (PCNA) (Gu *et al.*, 1998) an der MMR beteiligt sind. RPA bindet und stabilisiert den korrekten DNA-Strang, der nach dem Hydrolyse des fehlgepaarten Strangs verbleibt. PCNA aktiviert die *Polymerase  $\delta$*  und scheint darüber hinaus noch an zahlreichen weiteren Vorgängen, die mit der Kontrolle und Reparatur von DNA zu tun haben, beteiligt zu sein (Warbrick, 2000).

## 2.4 Zusammenhang zwischen MLH1, dem Lynch-Syndrom und Colitis ulcerosa

Das 57360 bp lange *MLH1*-Gen umfasst insgesamt 19 Exons und kodiert für das 756 Aminosäuren lange MLH1-Protein, welches ganz entscheidend an der postreplikativen Mismatch-Reparatur beteiligt ist. Strukturell besteht das Protein aus einer ATPase-Domäne und einer Dimerisierungsdomäne für die Interaktion mit PMS2, MLH3 oder PMS1.

MLH1 ist Mitglied einer als GHKL-Superfamilie bezeichneten Gruppe von ATPasen (Dutta & Inouye, 2000). Neben den MutL-Proteinen gehören auch Typ II DNA Topoisomerasen, Hsp90 und Histidinkinasen dieser neueren Klasse von ATPasen an (Mushegian *et al.*, 1997). Kennzeichnend sind vier aufeinander folgende Sequenzmotive (EXXXNXXD, DXGXG, GXXGXG/A und GT) und die Tatsache, dass ATP-Einfluss wahrscheinlich zu einer Art Ringschluß der Proteine führt.

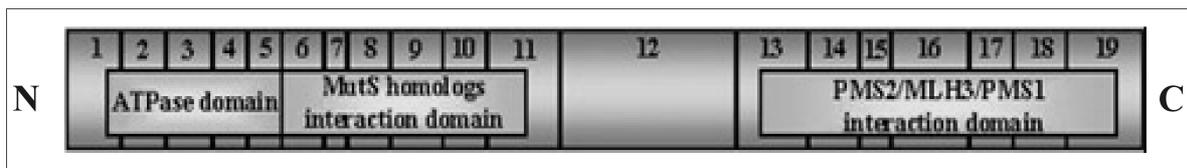


Abbildung 3 MLH1-Protein

Das *MLH1*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 3 auf Position 21.3. Zahlreiche Untersuchungen konnten für diese genetische Region einen kausativen Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nachweisen (Satsangi *et al.*, 1996b; Hampe *et al.*, 2001; Duerr *et al.*, 2002; Raptis *et al.*, 2007). Bereits 1997 gelang es Pokorny und seinen Mitarbeitern, eine Assoziation zwischen dem Auftreten chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und einem Polymorphismus in einem Intron des *MLH1*-Gens nachzuweisen (Pokorny *et al.*, 1997). Dieses Ergebnis konnte nachfolgend von einer italienischen Forschergruppe bestätigt werden (Annese *et al.*, 2002a). In einer kürzlich erschienen Studie gelang es auch Bagnoli *et al.*, einen Zusammenhang zwischen *MLH1* und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu zeigen. Die Forschergruppe um Bagnoli fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem homozygoten Auftreten des Polymorphismus 655 A>G (I219V) im *MLH1*-Gen und der „refraktären“ Colitis ulcerosa (Bagnoli *et al.*, 2004). Die in der kaukasischen Bevölkerung relativ häufig auftretende *MLH1*-655 A>G-Alteration, verändert die Aminosäuresequenz des MLH1-Proteins, geht aber nicht mit der für das Lynchsyndrom typischen Prädisposition für kolorektale Tumore einher. Aus diesem Grund spricht man bei dieser Alteration nicht von einer Mutation, sondern klassifizierte sie als Polymorphismus.

Die Inaktivierung von *MLH1* führt zu einer genetischen Instabilität, die als Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) bezeichnet wird (Modrich & Lahue, 1996). Etwa 95% der erblich bedingten nicht-polypösen kolorektalen Karzinome (als HNPCC oder Lynch-Syndrom bezeichnet) und

10-15% der sporadischen kolorektalen Karzinome weisen eine solche MSI auf. Während bei HNPCC *MLH1* hauptsächlich durch heterozygote Keimbahnmutationen inaktiviert wird, resultiert die Inaktivierung bei sporadisch auftretenden Kolonkarzinomen meist aus der Hypermethylierung der *MLH1*-Promoterregion (Kuismanen *et al.*, 2000). Interessanterweise fand man kürzlich sowohl in nicht dysplastischer Kolonmukosa als auch in Colitis ulcerosa-assoziierten Tumoren Mikrosatelliten-Instabilität, die ebenfalls mit Hypermethylierung und verminderter Expression des *MLH1*-Gens assoziiert war (Brentnall *et al.*, 1996; Fleisher *et al.*, 2000). Diese Tatsache deutet möglicherweise darauf hin, dass ein nicht intaktes MMR-System ursächlich an der Entstehung der Colitis ulcerosa beteiligt sein könnte.

## **2.5 Ziele der Arbeit**

Das Ziel der Studie bestand darin, zu untersuchen ob der *MLH1*-655 A>G Polymorphismus ursächlich mit der Entstehung und dem Verlauf der Colitis ulcerosa zusammenhängt. Um zu bewerten, ob der Polymorphismus statistisch signifikant mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert ist, wurden Colitis ulcerosa-Patienten und gesunde Kontrollpersonen auf das Vorliegen des *MLH1*-I219V Polymorphismus hin untersucht und die Ergebnisse der beiden Gruppen miteinander verglichen. Weiterhin wurde mit Hilfe bioinformatischer und biochemischer Methoden überprüft, ob die genetische Alteration zu einer Funktionseinschränkung des *MLH1*-Proteins führt.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Patienten und Materialien

#### 3.1.1 Laborgerät

Agarose-Gelapparaturen	Horizon 11.4, Gibco, Eggenstein
Analysenwaage	Satorius, R 160P-D1, Göttingen
Autoklav	HA-300M3CF, Wolf, Geislingen
Automatische Pipettierhilfe	Pipetus Akku, Hirschmann, Eberstadt
Bakterienbrutschrank	WTB, Bindler, Tuttlingen
Bakterienschüttler	TR 225, Infors, Bottmingen
Chemikalienwaage	Sartorius, Göttingen
Elektroblotapparat	Multiphor II, Pharmacia Biotech Nova Blot
Elektrophoresetransformator	Power Supply E 835, Consort, Turnhout
Elektrophoresekammer	Horizon 11.4, Gibco, Eggenstein
Fotoapparatur	MP4 Modell 44-16, Polaroid, Cambridge
Hypercassette™	Ammersheim, Braunschweig
Mikrowellenherd	SS 611, Bosch, München
Pipetten	Pipetman 10yl, 20yl, 200yl, 1ml, Gilson, Villiers-le-Bel
Schüttelinkubator	Certo U, B. Braun, Berlin
Schüttler, Vortex	Reax Top, Heidolph, Kelheim
Semi-dry-Blotter	Pharmacia, Freiburg
Sequenziergerät	Abi Prism 3100 Genetic Analyzer Applied Biosystems, Foster City
Sequenzierungssoftware	DNA Sequencing Analysis 3.7 Applied Biosystems, Foster City
Spektralphotometer	UV-DU 800, Beckmann-Coulter, Fullerton
Sterilbank	Heraeus HS12, Kendro, Hanau
Thermocycler 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermocycler 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt

Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Weiterstadt
Thermomixer	Compact 5350, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Micro Centrifuge SD 220 VAC, Roth, Karlsruhe
	Spectrafuge Mini C1301, Labnet, Woodbridge
UV-Lampe FluoLink	Biometra, Göttingen
Vertikalelektrophoresekammer	Protean II, Biorad, München
Wasserbad	1092 GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Rotanda 46R, Hettich, Tuttlingen
	5417C, Eppendorf, Hamburg
	5417R, Eppendorf, Hamburg
	5702, Eppendorf, Hamburg

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Collection Tubes 2 ml	Sigma, Deisenhofen
Eppendorfgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Desinfektionsmittel Freka Nol	Fresenius, Bad Homburg
Filterpapier	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala
Glaspipetten (5 ml/10 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Hyperfilm™ MP	Amersham, Braunschweig
Küvetten (10 x 10 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schüll, Dassel
PCR-Reaktionsgefäße	Multiply Pro, Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (150 x 20 mm, 100 x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen steril (10 µl, 20 µl, 200µl, 1 ml)	Starlab, Ahrensburg
Pipettenspitzen unsteril (0,2 ml, 1ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzküvetten	Heraeus, Hanau
Vacutainer-CPT- Röhrchen	Becton Dickonson, Heidelberg
Wasser steril	Braun, Melsungen
Zellkulturflaschen (25, 75, 175 cm <sup>2</sup> )	Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Costar, Wiesbaden

### 3.1.3 Verwendete Kit-Systeme

AbiPrism BigDyeTerminator kit	Applied Biosystems, Foster City
QIAamp DNA Mini-Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Maxi Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.4 Allgemeine Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid (30:1)	Sigma, Deisenhofen
Agarose Broad Range	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	Boehriner, Mannheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
dNTP (10 mM)	Applied Biosystems
ddNTP (10mM)	Applied Biosystems
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	ICN Biomedicals, Eschwege
DTT	Boehring, Mannheim
ECL-Detektionsreagenz	Amersham, Braunschweig
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Nunc, Heidelberg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
LB-Agar	Gibco BRL, Karlsruhe

Luria Broth Base (LB)	Gibco BRL, Karlsruhe
Lysis-Puffer (10x)	Biolabs, New England
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Milchpulver, fettfrei	Biorad, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Nukleotidmix (Je 100mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Sigma, Deisenhofen
PBS (dulbeccos)	Gibco BRL, Karlsruhe
PCR-Puffer (5x Konz.)	Invitrogen, Groningen
PMSF	Boehring, Mannheim
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Reinstwasser	Braun, Melsungen
Roti-Load1 (4x Konz.)	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Riedel de Haen, Hannover
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	US Biochemical, Cleveland
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween 20	ICN Biomedicals, Eschwege

### 3.1.5 Molekularbiologische Chemikalien

#### 3.1.5.1 Restriktionsendonukleasen

<i>Dpn I</i>	Stratagene, Heidelberg
<i>ASE I</i>	New England Biolabs, Frankfurt

#### 3.1.5.2 Weitere Enzyme

<i>Ampli Taq Gold</i> -Polymerase	Applied Biosystems, Foster City USA
Pfu-Turbo DNA-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim

RNase

Boehringer, Mannheim

### 3.1.5.3 DNA-Längenstandards

DNA Molecular Weight Marker XIV

Roche Applied Science, Penzberg

Fragmente einer Länge von 100 bis 2642 bp

Lambda DNA/Eco 130I (STYI) Marker, 16

Fermentas, Vilnius

Fragmente einer Länge von 421 bis 19329 bp

### 3.1.5.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden mittels Primer 3 Programm ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) ausgewählt und von der Firma Operon, Köln synthetisiert.

Sequenz Name	Sequenz 5`-3`
MLH1-8b-F (Sense)	TTGCTGGTGGAGATAAGGTT
MLH1-8b-R (Antisense)	TGTGATGGAATGATAAACCAAGA
MLH1 I219V (Sense)	ACAATATTCGCTCCGTCTTTGGAAATGCTG
MLH1 I219V (Antisense)	CAGCATTTCCAAAGACGGAGCGAATATTGT

Tabelle 1 Oligonukleotidprimer

### 3.1.6 Puffer und Lösungen

#### 3.1.6.1 Allgemein verwendete Puffer

- TE: 10 mM Tris-HCL, pH 8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

- TBE( 5-fach konzentriert): 445 mM Tris-HCL, pH 8,0  
10 mM EDTA pH 8,0  
445 mM Borsäure
- DNA-Proben-Puffer: 30 mM BromPhenolblau  
1750 mM Saccharose  
20 mM EDTA pH 8,0  
6000 mM Harnstoff

### 3.1.6.2 Lösungen und Puffer für die Transfektion

- Calciumchlorid-Lösung 2M
- 2\* HEPES-Puffer, pH 7,07

### 3.1.6.3 Puffer für die native Gesamtproteineextraktion

- Puffer A (hypotoner Puffer): 20 mM HEPES, pH 7,9  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM EDTA  
10 mM NaCl  
10 mM NaF  
0,5 mM DTT  
0,5 mM PMSF
- Puffer C (hypertoner Puffer) 20 mM HEPES, pH 7,9  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
0,1 mM EDTA  
840 mM NaCl  
10 mM NaF  
40 % (m/v) Glycerol  
0,5 mM DTT  
0,5 mM PMSF

### 3.1.6.4 Puffer für die DISC-Elektrophorese und Western Blotting

- Laufpuffer:
  - 25 mM Tris
  - 200 mM Glycin
  - 1% [w/V] SDS in Aqua dest.
- TBS (10x):
  - 1 M NaCl
  - 0,1 M Tris-Base pH 7,5 in H<sub>2</sub>O
- TBS-T:
  - 10 % 10x TBS
  - 0,05 % [v/v] Tween-20 in H<sub>2</sub>O
- Blockpuffer:
  - 3 % Milchpulver in TBS-T
- Blot-Puffer:
  - 50 mM Tris-Base
  - 40 mM L-Glycin
  - 20 % SDS
  - 20 % [v/v] Methanol
  - 0,0375 % [w/v] SDS, pH 8,3 in Aqua dest.

### 3.1.6.5 Puffer und Lösungen für den MMR-Assay

- ATP-Lösung (300 mM):

178 mg ATP werden in 1ml Wasser gelöst und mit NaOH 50% (10-50 µl nötig) tropfenweise neutralisiert
- Glutathion-Lösung (500mM):

153 mg Glutathion werden in 1ml PCR-Wasser gelöst und mit NaOH (1-30 µl nötig) tropfenweise neutralisiert.
- Reparaturgrundpuffer:

4,84 g 400 mM Tris HCl und 4,06g 200mM MgCl<sub>2</sub> werden eingewogen, in 100 ml Wasser gelöst und der pH auf 7,6 eingestellt.

- Reparaturpuffer (10x):

250 µl Reparaturgrundpuffer (20x)

Je 5 µl 100 mM dNTP(dCTP, dGTP,dTTP)

50 µl 300mM ATP-Lösung

25 µl 10 mg/ml BSA-Lösung (NEB)

10 µl 500mM Glutathion-Lösung

150 µl PCR-Wasser

1:10 verdünnen und auf 100µl aliquotieren

- tRNA-Lösung (100mg/ml und 1mg/ml):

50 mg tRNA werden in 500 µl PCR-Wasser gelöst (tRNA 100mg/ml)

Von dieser Lösung werden 10 µl in 990 µl Wasser gelöst (tRNA 1mg/ml)

- Stop-Lösung

90 µl/ml Proteinase K (Qiagen)

25 mM Dinatrium-EDTA

0,7% Natriumdodecylsulfat (SDS)

- 1M HEPES-KOH pH 7,5:

23,8 g HEPES mit Wasser auf 80 ml lösen, mit KOH-Pellet pH auf 8 einstellen und mit konz. KOH weitertitrieren.

### 3.1.7 Verwendete Antikörper

Anti-hMLH1 (G168-728)

Pharmagen, San Diego,

Anti-hPMS2 (A16-4)	Pharmagen, San Diego, CA
Anti-hMSH2 (M34520)	Transduction Laboratories, Lexington,
Anti-Maus IgG, Peroxidase (HRP) gekoppelt	Amersham Life Technologies

### 3.1.8 Medien

#### 3.1.8.1 Medienkomponenten für die Bakterien-Zellkultur

- LB-Medium (pro Liter H<sub>2</sub>O):  
(Fertigpulver Gibco BRL Karlsruhe)
  - 10 g Pepton aus Fleisch
  - 5 g Hefeextrakt
  - 10 g NaCl
- LB-Agar (pro Liter H<sub>2</sub>O):  
(Fertigpulver Gibco BRL Karlsruhe)
  - 10 g Pepton aus Fleisch
  - 5 g Hefeextrakt
  - 10 g NaCl
  - 12 g Agar
- SOC-Medium (pro Liter H<sub>2</sub>O)  
(Fertigpulver Invitrogen, Groningen)
  - 20 g Pepton aus Fleisch
  - 5 g Hefeextrakt
  - 0,5 g NaCl
  - 0,186 g KCl
  - 2,4 g MgSO<sub>4</sub> Heptahydrat
  - 20 mM Glucose

Die aufgeführten Medien wurden in deionisiertem Wasser angestzt. In sterilem Zustand benötigte Medien wurden für 20 min bei 1,3 bar autoklaviert.

#### 3.1.8.2 Medienkomponenten für die eukaryontische Zellkultur

- 500ml DDM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- 10 % FCS (fetal calf serum)

### 3.1.9 Bakterienstämme und eukaryontische Zelllinien

#### 3.1.9.1 Verwendete *E.coli* K 12 Stämme

- JM109                      endA1, gyrA96, thi, hsdR17(r<sup>-k</sup>, m<sup>+k</sup>), relA1, supE44,Δ (lac-proAB), [F, traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15]
- INVαF<sup>+</sup>                      endA1, recA1, hsdR17 (r<sup>-k</sup>, m<sup>+k</sup>), supE44, λ, thi-1, gyrA, relA1, Φ80lacZαΔM15Δ (lacZYA-argF), deoR<sup>+</sup>, F<sup>+</sup>

Beide *E.coli*-Stämme wurden kompetent von der Firma Invitrogen, Goringen bezogen.

#### 3.1.9.2 Verwendete Zelllinie

- HEK 293T-Zellen:

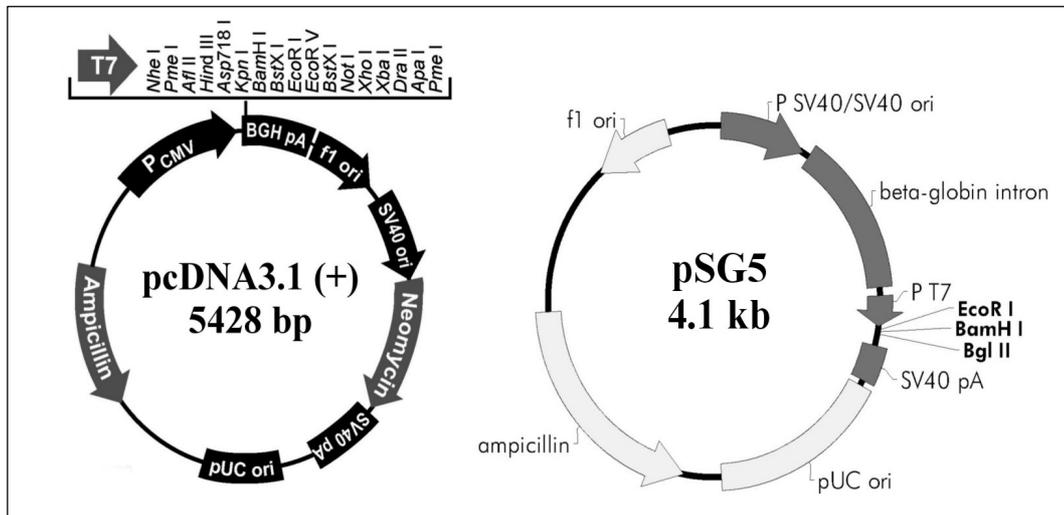
Die HEK 293T Zellen sind adhärent wachsende humane embryonale Nierenzellen (human embyonic kidney), die durch das DNA-haltige Adenovirus Typ 5 (Ad-5) tumorigen transfiziert und dadurch immortalisiert wurden. Neben der Ad5 E1 Region enthalten die Zellen zusätzlich stabil integriert SV40 T-Antigen. Dies ermöglicht den Zellen die Replikation von Vektoren, die einen SV40 Replikationsursprung enthalten. Die Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Josef Jiricny, Zürich zur Verfügung gestellt.

### 3.1.10 Eukaryontische Expressions- und Klonierungsvektoren

- pcDNA3 und pSG5

Für die eukaryontische Expression wurden die Vektoren pSG5 (Firma Start und pcDNA3 verwendet. Beide verfügen über einen *f1-ori* zur Replikationsinitiation in *E. coli*. Zur Selektion transformierter *E. coli*-Klone haben beide Plasmide einen Ampicillin-Resistenzmarker, pcDNA3 zusätzlich noch eine Neomycin-Resistenz. Außerdem enthält pSG5 einen frühen *SV40* Promotor, welcher die starke Expression

in Zellen, welche mit dem großen T-Antigen stabil transfiziert sind, bewirkt. Die *SV40 ori*-Sequenzen erhöhen die episomale Replikation. Die Polyadenylierungssignale (SV40 pA) erhöhen weiterhin das Expressionsniveau.



**Abbildung 4** Aufbau der eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 und pSG5

PcDNA 3 wurden von der Firma Invitrogen, Karlsbad bezogen, pSG5 stammt von der Firma Startagen, La Jolla. Dr. Hong Zhang (Huntsman Cancer Institute, Universität of Utah, Salt Lake City, UT) stellte uns den Expressionsvektor pcDNA3 mit dem der entsprechenden hMLH1-Sequenz zur Verfügung. Der pSG5 Vektor der hPMS2 exprimiert wurde freundlicherweise von Prof. Bert Vogelstein (Johns Hopkins Oncologie Center, Baltimore, MD) zur Verfügung gestellt.

- pUC 19CPDC

Das Plamid pUC 19CPDC wurde von Prof. John B Hays bezogen und von der Firma Startagene in dem E-Coli-Stamm SCS110 ( $dcm^-$ ,  $dam^-$ ,  $endA^-$ ) vermehrt. Anschließend wurde ein Testplasmid generiert, dass zwei Ase 1 Restriktionsstellen enthält, von denen eine eine G-T Basenfehlpaarung aufweist. Zusätzlich wurde ein Einzelstrangbruch(=nick), der 141bp von der Mismatchstelle entfernt liegt, eingebaut. (siehe 4.3.2 Abbildung 17)

### **3.1.11 Patienten und Kontrollgruppe**

Der Hauptteil der untersuchten Proben entstammt Personen, die sich zwischen Juli 2005 und Mai 2006, aufgrund unterschiedlicher Indikationen, in der gastroenterologischen Ambulanz der Universität des Saarlandes vorstellten. Die Personen wurden ausführlich über Sinn und Zweck der wissenschaftlichen Untersuchung informiert. Nach schriftlicher Einwilligung wurden 10ml Blut entnommen und daraus DNA isoliert. Zusätzlich wurde Probenmaterial von Personen verwendet, die sich in der Zeit von Oktober 2002 bis April 2005 einer Koloskopie unterzogen. Bei der koloskopischen Untersuchung wurden kleine Gewebeproben aus gesunder Kolonschleimhaut entnommen und hieraus DNA gewonnen. Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 67 Patienten mit gesicherter Diagnose einer Colitis ulcerosa (CU) und einem Kontrollkollektiv, bestehend aus 40 Personen ohne anamnestische oder klinische Hinweis auf eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung, gegenübergestellt. Die Patientengruppe umfasste 33 Frauen und 34 Männer mit einem Durchschnittsalter von 42 Jahren. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose betrug 34 Jahre. Das Vergleichskollektiv bestand aus 18 Frauen und 22 Männern, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Mittel 55 Jahre alt waren.

Ziel der Arbeit war, den Zusammenhang zwischen dem I219V Polymorphismus und der Entstehung bzw. dem klinischen Verlauf der Erkrankung zu untersuchen. Zur Bestimmung des klinischen Verlaufes wurden folgende Parameter aus den Patientenakten herangezogen:

#### **1. Alter bei Erstdiagnose und Geschlecht**

#### **2. Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung**

Dabei wurden Patienten mit einer Pancolitis (Befall der gesamten Kolon- und Rektumschleimhaut), von solchen mit einer Proktitis oder einem linksseitigen Kolonbefalls (Befall bis zur linken Kolonflexur) unterschieden.

#### **3. Therapieform**

Die Patienten wurden in drei mögliche Therapiegruppen unterteilt. Die erste Gruppe bekam eine 5-ASA- oder Steroidtherapie, die zweite Gruppe fasste diejenigen zusammen, die eine immunsuppressive Behandlung mit Azathioprin oder 6-Mercaptopurin erhielten (sterodirefraktär oder steroidabhängig) und die dritte Gruppe bestand aus solchen, die sich einer operativen Therapie unterzogen hatten. Zusätzlich

wurden die Patienten mit 5-ASA- oder Steroidtherapie Patienten gegenübergestellt, die wegen steroidrefraktärem oder -abhängigen Krankheitsverlaufes oder häufigen Erkrankungsschüben (mindestens 2 pro Jahr), mit Immunsuppressiva oder gar einer operativen Therapie behandelt werden mussten. Diese Gruppe wurde als „refraktär“ eingestuft.

Anschließend wurden die klinischen Parameter mit den molekularbiologisch ermittelten Genotyphäufigkeiten korreliert.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Aufbereitung der Blutproben und Gewinnung der genomischen DNA

10 ml Vollblut wurden mittels Vacutainer-CTP-Röhrchen abgenommen und zentrifugiert (20min, 20 °C, 2730 U/min). Der Überstand (Plasma + Leukozyten) wurde leicht geschüttelt, um die am Zwischenboden des Röhrchen haftenden Leukozyten zu lösen, in 50 ml-Falcon-Röhrchen dekantiert, mit sterilem PBS Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min, 20°C, 1500 g). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, die pelletierten Leukozyten nochmals mit 50 ml PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (10 min, 20 °C, 1500 g). Nach vorsichtigem Abnehmen und Verwerfen des Überstandes bis auf 200 µl zurücklaufendes PBS wurden in diesem Volumen die pelletierten Leukozyten resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-gefäß pipettiert.

Die genomische DNA wurde aus den peripheren Blutleukozyten mittels QIAamp DNA Mini-Kit nach Herstellerangaben wie folgt isoliert:

Die resuspendierten Leukozyten wurden mit 20 µl Proteinase K und 200 µl im Kit enthaltenen AL Puffer nach guter Durchmischung für 10 min bei 70 °C inkubiert. Nach Zusatz von 200 µl Ethanol und erneutem Mischen wurde die Probe in die vorhergesehene Säule übertragen und bei 8000 U/min für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in zwei Schritten mit je 500 µl Waschpuffer bei 8000 U/min für eine Minute bzw. 14000 U/min für drei Minuten gereinigt. Im letzten Schritt wurde die gereinigte DNA durch Zentrifugation bei 8000 U/min für eine Minute mit 200 µl Puffer aus der Säule eluiert.

Für die weitere Verwendung wurde die DNA im Verhältnis 1:50 mit destilliertem H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C tiefgefroren.

### 3.2.2 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Saiki (Mullis et al., 1986) entwickelte Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische Vermehrung DNA-Sequenzen *in vitro*. Sie basiert auf der Hybridisierung zweier Oligonukleotid-Primer, die die jeweilige Zielsequenz flankieren, mit der denaturierten Ausgangs-DNA. Diese durch die Anlagerung der Primer gebildeten kurzen, doppelsträngigen Bereiche dienen als Initiationsstellen der Replikation für die hitzestabile

*Thermus aquaticus*-Polymerase bzw. die von dieser Polymerase abgeleiteten kommerziell erhältlichen Polymerasen. Nach Aktivierung der in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen *Ampli Taq Gold*-Polymerase durch eine Vorinkubation von 10-12 min bei 95°C folgen eine Reihe sich wiederholender Zyklen, bestehend aus der Denaturierung der synthetisierten DNA-Stränge, der Hybridisierung der Oligonukleotide und der Elongation durch die Polymerase. Dies führt zur exponentiellen Akkumulation der spezifischen DNA-Fragmente. In dieser Arbeit wurde zur Amplifikation des Exons 8 des MLH1-Gens folgendes Standard-PCR-Pipettierschema (Tabelle 2) angewendet:

Zusammensetzung	MLH1/Exon8	Volumen	Endkonzentration
5 x optimierter PCR- Puffer A,B,C oder D ( Invitrogen)	D	10µl	Siehe Hersteller
Nucleotid-Mix (jedes 2,5µM)		5µl	je 250µM
Sense Primer (10µM)	MLH1 8S	5µl	1µM
Antisense Primer (10µM)	MLH1 8AS	5µl	1µM
Ampli Taq Gold Polymerase		1µl	0,1 U/µl
DNA Substrat	1:50	10µl	
mit Wasser auf		50 µl	

**Tabelle 2 Standard-Pipettierschema der PCR des Exon 8 des MLH1-Gens**

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem ABI 9600 oder 9700 Cyclern durchgeführt. Falls nicht anders angegeben, wurden als Standard- PCR-Bedingungen folgende Parameter verwendet: 10 min 95° C, dann 35 Zyklen: 30 s 95 °C, 30 s 55 °C, 1 min 72 °C, dann 10 min 72 °C. Für die Optimierung der PCR Bedingungen (MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, pH-Wert) wurde der Puffer D des *Optimimed Buffer-Kits* von Invitrogen verwendet. Die erhaltenen PCR-Produkte konnten anschließend gelelektrophoretisch analysiert und zur weiteren Anwendung aufgereinigt werden.

### 3.2.3 Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihren Molekulargewichten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurden 2%ige Agarosegele, die sich vor allem zur Auftrennung kleinerer PCR-Produkte (ca. 200 bis 600 Bp) eignen, eingesetzt.

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden 2 g Agarose in 100ml 0,5x TBE-Puffer in einem Mikrowellengerät gelöst, Ethidiumbromid (230µg/ml) zugegeben und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in eine Gießkammer eingefüllt. Anschließend wurden ein bis zwei Probekämme mit 14 bzw. 20 Zähnen eingesetzt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit 0,5x TBE-Puffer befüllte Horizontal-Gelapparatur gelegt und die mit DNA-Puffer versetzten Proben (2µl Probenpuffer +10µl Probe) in die Geltaschen gegeben. Die DNA-Fragmente wurden ca. 20min mit einer Feldstärke von etwa 1-5 V/cm<sup>2</sup> getrennt. Anschließend wurden die Banden mit UV-Licht (305nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera durch orange-rot Filter fotografiert. Die Fragmentgrößen wurden durch gleichzeitiges Auftrennen eines DNA-Längenstandards bekannter Größe bestimmt.

### 3.2.4 Aufreinigung der DNA-Fragmente

Die spezifischen DNA-Fragmente wurden nun mittels QIAquick PCR Purifikation Kit der Firma Qiagen von den PCR-Primern, der DNA-Polymerase, Salzen und den freien dNTPs getrennt. Dazu wurde 200µl PB Puffer zu den PCR-Produkten hinzugefügt und auf die Silicon-Gel-Membran der im Kit enthaltenen Proberöhrchen pipettiert. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 13000 U/min befand sich die DNA nun auf der Membran. Um die DNA zu reinigen, wurde 0,75 ml Puffer PE zugeben und für 1min bei 13000 U/min zentrifugiert. Um die gereinigte DNA von der Membran zu eluieren, wurde nach Zugabe von 50µl EB Puffer erneut zentrifugiert (13000 U/min, 1min).

### 3.2.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung diente dazu den betreffenden Abschnitt des *MLH1*-Gens auf den Polymorphismus I219V zu untersuchen.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem AbiPrism BigDye-System durchgeführt.

Das System beruht auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Hierbei werden zu den Desoxy-Nukleotid-Triphosphaten (dNTPs) fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Dideoxy-Nukleotid-5'-Triphosphate (ddNTPs) in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt. Der Einbau dieser dNTPs in den Zweitstrang bewirkt den Abbruch der Synthese, so dass man an jeder Base farbmarkierte Abbrüche des PCR-Produktes enthält, die man dann elektrophoretisch auftrennen kann.

Zu den 2 µl Sequenziermix (dNTPs, ddNTPs, thermostabile Polymerase, Puffer) wurden 1 µl Primer (10 µM) und 2µl PCR-Produkt pipettiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 5 µl destillierten H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Zur Durchführung der Sequenzierungs-PCR wurden folgende Parameter verwendet: 2 min 95 °C, dann 30 Zyklen mit 30 sec 95 °C (Denaturierung), 15 sec 55 °C (Annealing), 4 min 60 °C (Elongation), anschließend folgt eine Abkühlung auf 4 °C.

Um die nicht eingebauten fluoreszenten Nukleotide aus der Reaktion zu Entfernen, wurde die Sequenzierungsreaktion über eine Säule gereinigt (DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen). Das Prinzip entspricht einer Gelfiltration, bei der die kleinen Moleküle in der Matrix hängen bleiben und die großen im Ausschlußvolumen eluieren.

Die aufgereinigte Sequenzierungsreaktion wurde mit einem ABI 3100 Sequenziergerät durch Kapillarelektrophorese und Detektion der Fluoreszenzsignale analysiert. Die Erhaltenen Fluoreszenzsignalkurven wurden anschließend auf den Polymorphismus I219V untersucht

### **3.2.6 Site directed mutagenesis**

Zum Einführen der Punktmutation I219V in das Mismatch-Reparaturprotein MLH1 wurde ein Expressionsvektor, der die codierende Sequenz für MLH1 enthält (pcDNA3-MLH1) mit Hilfe des QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verändert.

Es wurden zwei ca. 30 Bp lange Primer generiert, die komplementär zueinander und komplementär zu der zu mutierenden Stelle im Plasmid sind, jedoch in ihrer Mitte die für den Austausch notwendige Sequenzveränderung I219V tragen. Während der PCR lagern sich die Oligonukleotid-Primer nun an die denaturierte Plasmid-DNA an und es erfolgt die Elongation der Primer mittels *Pfu Turbo DNA-Polymerase* (der Vorteil dieser Polymerase gegenüber der *Taq-Polymerase* besteht darin, dass die *Pfu Turbo DNA-Polymerase* eine Korrekturlesefunktion hat und dadurch die Fehlerrate reduziert wird). Durch vielfache

Wiederholung dieses Vorgangs amplifiziert man ein Plasmid, welches die gewünschte Mutation enthält.

Die oben beschriebene Mutagenese-PCR wurde auf Eis angesetzt und enthält folgende Komponenten:

- |  |       |
|--|-------|
| • Wasser                                     | 18 µl |
| • Plasmid ( Soll:25 ng, MLH1 Maxiprep 1:100) | 5 µl  |
| • Pfu Ultra-Puffer (10x)                     | 5 µl  |
| • F-Primer (1 µM, MLH1 I219V)                | 10 µl |
| • R-Primer (1 µM, MLH1 I219V)                | 10 µl |
| • dNTP Mix                                   | 1 µl  |
| • Pfu Turbo Polymerase                       | 1 µl  |

Die *Pfu Turbo Polymerase* wurde dabei als letztes zugegeben.

Der Ansatz wurde nun vom Eis direkt in den auf 95 °C vorgeheizten Cycler gestellt. Zur Durchführung der Mutagenese-PCR wurden folgende Parameter verwendet:

30 s 95 °C, dann 16 Zyklen mit 30 sec 95 °C (Denaturierung), 1 min 55 °C (Annealing), 8 min 68 °C (Elongation), anschließend folgt eine Abkühlung auf 4 °C.

Um die nicht-mutierten Ursprungsplasmide aus der Probe zu entfernen, wurden zu dem Ansatz 1 µl der Restriktionsendonuklease DpnI hinzugefügt, sorgfältig durch Pipettieren gemischt, zentrifugiert und bei 37 °C 1 Stunde inkubiert. Da dieses Enzym nur methylierte bzw. hemimethylierte DNA schneidet und nur die ursprünglichen Plasmide methyliert sind, werden nur die ursprünglichen, von Bakterien gebildeten Plasmide verdaut. Die unmethylierten, neusynthetisierten Plasmide, die die Mutation enthalten, bleiben erhalten. Anschließend wurde die Probe in *E. coli* transformiert. Nach der Mini-Präparation wurde dann der mutierte Bereich im Gen durch Sequenzierung überprüft. Von den fehlerfreien Klonen wurde dann mittels Maxi-Präparation DNA für weitere Transfektionsversuche angefertigt.

### **3.2.7 Transformation der Plasmide in *E.coli***

Unter Transformation versteht man in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien. Zur Anlagerung der DNA an die Bakterienzellen wurden 50 µl superkompetente *E.coli* zusammen mit 1 µl der PCR-Reaktion in ein bereits vorgekühltes Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf Eis für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden, um die Aufnahme der DNA in die Zelle zu erleichtern, für 45 sec einem Hitzschock von 42°C ausgesetzt und anschließend erneut für 3 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium wurde die Zellsuspension für 1 Stunde bei 37 °C und 1400 U/min geschüttelt. Dann wurden sie à 200µl auf LB+Ampicillin-Platten ausgestrichen und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Durch die Ampicillinresistenzen für die der pcDNA3-Vektor kodiert, wachsen nur transformierte Bakterien auf der Platte.

### **3.2.8 Plasmid-Mini-Präparation**

Zur Aufreinigung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde der Qiagen Spin Miniprep Kit verwendet. Hierfür wurde eine *E.coli*-Übernachtskultur in LB+Ampicillin-Medium bei 15000 U/min sedimentiert. Die Pellets wurden dann in einem RNase- haltigem Puffer resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup überführt. Anschließend wurden die Zellen unter alkalischen Bedingungen und unter Anwesenheit von SDS lysiert. Nach der Neutralisation wurde bei 13000 U/min für 10 min zentrifugiert, um die lösliche Plasmid-DNA von einem Präzipitat aus chromosomaler DNA, Zellbestandteilen, Proteine und SDS zu trennen. Der Überstand, der die lösliche Plasmid-DNA enthält, wurde auf eine Säule pipettiert und bei 13000 U/min bei 4 °C für 1 min zentrifugiert. Es folgte ein Waschschriff mit PE Puffer und die Elution der Plasmid-DNA mit 50 µl EB Puffer. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

### **3.2.9 Plasmid- Maxi-Präparation**

Zur Isolation von Plasmiden im Milligramm-Bereich wurde eine Plasmid-Maxi-Präparation durchgeführt. Hierfür wurden 250ml LB+Ampicillin- Medium mit 500µl einer *E. coli* Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden am nächsten Tag sedimentiert, 1x mit PBS

gewaschen und die Plasmide mittels QIAfilter Maxi Kit isoliert. Dazu wurden die Pellets in einem RNase-haltigem Puffer resuspendiert, die Zellen unter alkalischen Bedingungen unter Anwesenheit von SDS lysiert und dann neutralisiert. Um die Präzipitate (chrom. DNA, Proteine, Zellbestandteile, SDS) von der Plasmid-DNA zu trennen, wurde die Probe durch einen Filter gepresst und auf eine vorher equilibrierte Säule aufgetragen. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde anschließend mittels dafür vorgesehener Puffer gewaschen und eluiert. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation für 30 min bei 15000 x g bei 4°C wurde die DNA präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 300 µl EB Puffer gelöst. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.2.10 Kultivierung von HEK 293T Zellen**

Die HEK 293T Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% in einem Zellkulturschrank kultiviert. Das Zellmedium wurde 2-mal pro Woche gewechselt. Bei Erreichen einer ca.70 %igen Konfluenz erfolgte die Passage der Zellen unter einem sterilen Abzug, um eine Kontamination zu vermeiden. Hierzu wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt, die Zellen 1x mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2ml Trypsin-EDTA-PBS-Lösung bei 37 °C für ca. 5 min im Zellkulturschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 8 ml frisches Kulturmedium (DMEM, 10% FCS) hinzugefügt und anschließend bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand (altes Medium, Trypsinreste und Zelltrümmer) wurde entfernt, die Zellen in 10 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und anschließend in einer 1:10 Verdünnung auf 75 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen verteilt.

### **3.2.11 Calciumphosphat-Transfektion von 293T Zellen**

Um die HEK 293T Zellen transient mit Plasmid DNA zu transfizieren, eignet sich besonders die billige und schnell durchführbare Calcium-Phosphat-Transfektion. Das Prinzip der Methode basiert darauf, dass sich in einer Mischung aus DNA, calciumchloridhaltiger Lösung

und einem Phosphatpuffer Calciumphosphatkristalle bilden, in denen die DNA enthalten ist. Die so entstandene Kristallsuspension wird für einige Zeit in das Kulturmedium der Zellen gemischt, die dadurch die Partikel mit samt der DNA aufnehmen und das Plasmid zur Expression bringen können. Ein wichtiger Vorteil der Methodik ist die Möglichkeit, zwei oder mehrere Plasmide in stöchiometrischen Mengen ko-transfizieren zu können.

Um die Zellen auf die Transfektion vorzubereiten, wurden diese 12-24h zuvor mit einer Dichte von 30-40% Konfluenz auf 75cm<sup>2</sup>-Kulturschalen neu ausgesät und eine Stunde vor Beginn der Transfektion mit vorgewärmtem, frischen Medium versetzt. Anschließend wurde mit der Herstellung der Kristallsuspension begonnen.

Hierzu wurden 500 µl 2x HBS-Puffer in einem 1,5 ml Cup bei Raumtemperatur vorgelegt. In einem zweiten Cup wurde ein Calciumchlorid-DNA-Mix mit den Endkonzentrationen von 40µg/ml Plasmid-DNA und 248 mM CaCl<sub>2</sub> angesetzt und tropfenweise, während langsamen Vortexens, zu der 2x HBS-Lösung hinzugefügt. Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur 20 min inkubiert und anschließend unter Schütteln zum Kulturmedium der Zellen gegeben. Die Schalen wurden mehrere Male leicht in der Waagerechten geschwenkt, um die Kristalle homogen zu verteilen. Nach 12-24 h wurden das Medium ausgetauscht und die Zellen nach 24-48 h geerntet und native Gesamtzellextrakte hergestellt.

### **3.2.12 Native Gesamtproteinextraktion**

293T Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschalen gelöst und nach Überführen in ein 15 ml Falcon bei 1000 g für 2 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand sorgfältig abgenommen war, wurden die Zellen im zweifach gepackten Zellvolumen eiskaltem Puffer A (siehe 3.1.6.3) resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und zum Zellaufschluß bei -80°C gefroren. Anschließend wurden sie zum Auftauen wieder auf Eis gestellt und dann mit dem gleichen Volumen Puffer C (siehe 3.1.6.3) gemischt. Die Suspension wurde bei 4 °C für eine halbe Stunde geschüttelt und dann zentrifugiert (4 °C, 10 min, 14000 rpm). Der Proteingehalt des Überstandes (nativer Gesamtproteinextrakt) wurde photometrisch gemessen und der Extrakt bei -80°C gelagert.

### 3.2.13 SDS-Disc-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Disc-PAGE)

Eine Auftrennung der zu untersuchenden Proteine erfolgte mittels SDS-Disc-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierten Bedingungen (Laemmli, 1970). Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein anionisches Detergenz, das stark an Proteine bindet und sie gleichzeitig denaturiert. Durch diese Bindung entstehen negativ geladene Komplexe, die die Eigenladung der Proteine maskieren. Dadurch ist es möglich, die Proteine entsprechend ihrer Größe und unabhängig von ihrer Ladung zu trennen. Um eine bessere Auftrennung zu erhalten, wurde zusätzlich zum eigentlichen Trenngel mit einem Sammelgel gearbeitet. Unterschiede im pH-Wert und in der Konzentration der beiden Gele führen dazu, dass sich die Proteine erst in engen Banden im Sammelgel konzentrieren, bevor die weitere Trennung im Trenngel erfolgt. Der Ansatz lautete folgendermaßen:

Trenngel (6ml pro Gel, Acrylamidkonzentration von 10%):

- |  |        |
|--|--------|
| • Stammlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) | 2,0 ml |
| • 1,88M Tris/HCl pH 8,8                          | 1,2 ml |
| • 0,5% SDS                                       | 1,2 ml |
| • Bidestiliertes Wasser                          | 1,6 ml |
| • TEMED  | 5,0 µl |
| • Ammoniumpersulfatlösung, 10%ig                 | 30 µl  |

Sammelgel (2 ml pro Gel, Acrylamidkonzentration von 5%):

- |  |         |
|--|---------|
| • Stammlösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) | 0,33 ml |
| • 0,625M Tris/HCl pH 6,8                         | 0,4 ml  |
| • 0,5% SDS                                       | 0,4 ml  |
| • Bidestiliertes Wasser                          | 1,0 ml  |
| • TEMED  | 2,0 µl  |
| • Ammoniumpersulfatlösung 10%ig                  | 10 µl   |

Das Trenngel wurde blasenfrei zwischen die beiden Glasplatten einer vertikalen Gelapparatur gegossen und mit Wasser überschichtet, um eine gleichmäßige Oberfläche für das folgende Sammelgel zu erhalten. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Wasser abgegossen und

das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Zum Ausformen von Sammeltaschen wurde ein Probenkamm in das noch flüssige Sammelgel getaucht und erneut die Polymerisation abgewartet. Nach Entfernen des Probekamms wurde das Gel in eine Elektrophorese-Gelkammer, welche mit Laufpuffer gefüllt war, übertragen und stand zur nachfolgenden Elektrophorese bereit.

10-20 µl der zu analysierenden Proben (entsprechend 10-50µg) wurden mit Roti-Load-Puffer vermischt, eine Minute auf 95 °C erhitzt und in die Sammeltaschen des SDS-Disc-Polyacrylamidgels pipettiert. Die anschließende elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei 25mA.

### **3.2.14 Western Blot**

Im Anschluss an die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteingemische wurden die Proteine durch das Western-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran übertragen um diese nachfolgend mit einem spezifischen Antikörper gegen die nachzuweisenden Proteine identifizieren zu können. Dazu wurde das Polyacrylamid-Gel auf eine passend zugeschnittene Nitrocellulosemembran überführt und in Transferpuffer getränkte Papierlagen eingebettet. Das so entstandene Sandwich (von oben nach unten: 9 Lagen Filterpapier/ Acrylamid-Gel/ Nitrocellulosemembran/ 9 Lagen Filterpapier) wurden anschließend in einem Semidry-Blotter für 90 min bei 55 mA geblottet. Zur Transferkontrolle wurde die Membran mit Ponceaurot angefärbt. Dazu wurde die Nitrocellulosemembran ca. 5min mit Ponceaurot inkubiert und die Farbe anschließend mit Wasser abgespült, wodurch die Banden sichtbar wurden. Um die Membran vor der Immundetektion vollständig von den Farbresten zu befreien, wurde diese für ca.5min mit PBS gewaschen.

### **3.2.15 Immunologischer Nachweis der Proteine durch Antikörper**

Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese bei Raumtemperatur für eine Stunde oder bei 4 °C über Nacht in Blockierungspuffer (Milchpulver-TBS/T-Lösung) geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit den jeweiligen Primär-Antikörpern, welche entsprechend der Herstellerempfehlungen in Blockierungspuffer

verdünnt eingesetzt wurden. Nach dreimaligem Waschen in TBS/T (je 5 Minuten) wurde der passende Sekundär-Antikörper (anti-Maus oder anti-Hase, Peroxidase-konjugiert, in einer Verdünnung von 1:5000 in Blockierungspuffer) für 30 Minuten auf die Membran gegeben.

Im Anschluss wurde erneut dreimal für je 5 Minuten mit TBS/T gewaschen und der peroxidasegekoppelte Antikörper mit ECL (*enhanced chemiluminescenc*)-Detektionsreagenz behandelt. Das Enzym Peroxidase oxidiert das in der ECL-Reagenz enthaltende Luminol unter Lichtemission. Die entstehende Chemilumineszenz wurde mit einem Hyperfilm TM MP in der Dunkelkammer detektiert. Die nachzuweisenden spezifischen Proteine könnten dadurch als gut abgrenzbare Banden dargestellt werden.

### **3.2.16 Mismatch-Reparatur-Assay (MMR-Assay)**

Der Mismatch-Reparatur-Assay (MMR) ist eine Methode, mit der sich die DNA Mismatch Reparatur *in vitro* nachstellen lässt. Dadurch werden viele diesen Reparaturprozesse angehenden Fragestellungen experimentell zugänglich. Im vorliegenden Fall sollt die Aktivität eines veränderten MLH1-Proteins untersucht werden.

#### **3.2.16.1 MMR-Reaktion**

Um die Reparatur zu untersuchen, wurde ein doppelsträngiges Testplasmid mit einer G/T Fehlpaarung (pUC19 CPDC GTN) mit Proteinextrakten inkubiert.

Pro Ansatz wurden 1,2 µl Wasser, 2,0 µl Reparaturpuffer, 0,7 µl KCl 500mM, 1,0 µl ATP 100mM, 0,7 µl KCl 500mM, 14,2 µl Kernextrakt (50µg) und 0,4 µl UC19 CPDC GTN auf Eis in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Zum Starten des Reparaturvorgangs wurde 0,5 µl 293T Gesamtextrakt (3 µg) hinzugefügt und der gesamte Ansatz 20 min bei 37 °C inkubiert.

Um die Reaktion anschließend zu beenden, wurden 25 µl Stop-Puffer hinzugegeben und erneut bei 37°C für 15 min inkubiert.

Der Stop-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

- 15 µl Wasser
- 2,0µl SDS-Lösung 10%
- 6,0µl DiNa-EDTA-Lösung 100mM
- 2,0µl Proteinase K Lösung 2µg/µl

Die im Stop-Puffer enthaltene SDS-Lösung führt zur Denaturierung der an der Reaktion beteiligten Enzyme, die Proteinase K dient dem anschließenden Verdau der Proteine.

Anschließend wurden die Proben auf 100µl mit TE-Puffer aufgefüllt und unter dem Abzug mittels Phenol/Chloroform-Extraktion extrahiert.

### **3.2.16.2 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Zur Reinigung der Plasmid-DNA von Proteinen und überschüssigen Reagenzien wurde die DNA enthaltende Lösung mit gleichem Volumen an Phenol (100µl) versetzt, gut durchmischt und 2min zentrifugiert. Die obere Phase (DNA-Wasser) wurde sorgfältig abgenommen und der gleiche Volumenanteil Chloroform hinzugefügt. Nach guter Durchmischung wurde erneut bei maximaler Geschwindigkeit 2min zentrifugiert und die obere Phase sauber abgenommen. Um die gewonnene DNA anschließend zu konzentrieren, kam die Ethanol-Präzipitation zum Einsatz.

### **3.2.16.3 Ethanol-Präzipitation**

Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren durch Zugabe von Ethanol als Natriumsalz aus wässrigen Lösungen ausgefällt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit 1 µl tRNA (als „Carrier“), 1/10 des Gesamtvolumens Natriumacetatlösung (3M, pH 5,2) und dem 2,5-fachen des Gesamtvolumens absolutem Ethanol versetzt. Die Präzipitation erfolgte für 30 min bei -20 °C. Anschließend wurde bei 2 °C und 14000 rpm für 30 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 50 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut bei 2 °C und 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 10-15 µl Resuspensionslösung zugefügt.

### **3.2.16.4 Resuspendierung/Verdau**

Um die Plasmid-DNA zu fragmentieren, wurde eine Resuspensionslösung angesetzt. Dazu wurden pro Probe 12 µl Wasser, 1,5 µl NEB Puffer Nr.3 und 1µl RNase A (1mg/ml) vermischt und die Restriktionsendonuklease *Ase I* zugefügt. Nachdem die DNA eine Stunde

bei 37°C verdaut wurde, konnten die entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese detektiert werden.

### **3.2.17 *In Silico*-Analyse**

Das Homologiemodell, das in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden war wurde folgendermaßen generiert:

Die Sequenz des MLH1-Proteins wurde mittels BLAST, einem Database Suchprogramm aus der NCBI Datenbank ermittelt. Mit Hilfe des Programms Crystal W wurde ein Alignment von humanen MLH1 homologen Sequenzen errechnet und mittels Sea View alignment editor bearbeitet. Anschließend wurde ein Homologie-Derivat-3D-Model von hMLH1 konstruiert. Hierzu wurde der WHAT IF Server verwendet. Als Grundlage wurde, die dem humanen MLH1 homologe Sequenz des MutL aus E.coli (Sequenzübereinstimmung von 35%), an welches ADPMg<sup>2+</sup> gebunden, verwendet. Die Sequenz des bakteriellen MutLs entstammte der Protein-Data-Bank (=PDB) (Kette A, 1b62). Das Sequenzstruktur-Alignment wurde mit Hilfe des Programms Gen Doc generiert. Die Sekundärstruktur von MutL wurde zusätzlich aus der DSSP Database entnommen. Mit Hilfe des PyMol Molecular Graphic System (<http://www.pymol.org>) wurde die Proteinstruktur graphisch dargestellt (siehe 4.2.1 Abb.9).

### **3.2.18 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Patientendaten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS. Zur Signifikanzbestimmung der Genotypverteilung bezüglich der klinischen Parameter: Alter, Geschlecht, Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung sowie Therapie wurde der Fisher`Exact Test herangezogen. P-Werte von  $\leq 0,05$  wurden als signifikant betrachtet.

### **3.2.19 Ethische Aspekte**

Alle wissenschaftlichen Untersuchungen wurden gemäß der Deklaration von Helesinki durchgeführt. Jeder Patient wurde vor der Endoskopie bzw. Blutentnahme schriftlich über die wissenschaftliche Auswertung der Proben aufgeklärt.

## **4. Ergebnisse**

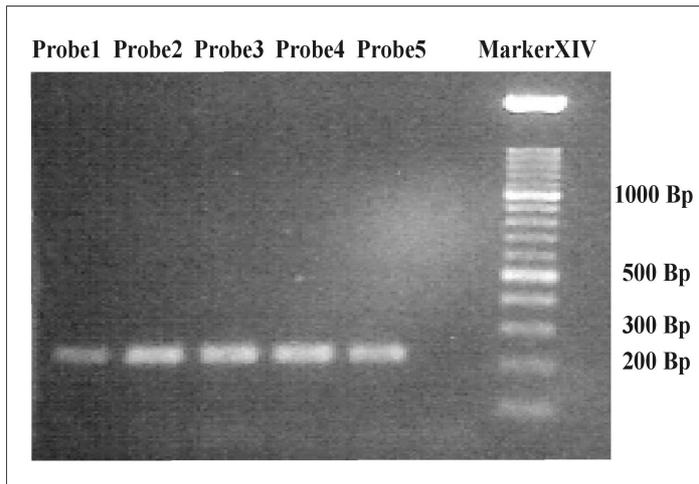
### **4.1 Untersuchung des Polymorphismus 655 A>G bei Patienten mit Colitis ulcerosa**

In unserer Studie wurden insgesamt 67 Patienten mit gesicherter Diagnose einer Colitis ulcerosa (CU) mit einem Kontrollkollektiv, bestehend aus 40 Personen ohne anamnestische oder klinische Hinweise auf eine entzündliche Darmkrankheit, verglichen. Um einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten des *MLH1*-655 A>G Polymorphismus und der Entstehung bzw. dem klinischen Verlauf der Erkrankung zu untersuchen, wurden die Genotyphäufigkeiten ermittelt und anschließend mit klinischen Parametern (Alter und Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Lokalisation und Ausdehnung, Therapieform und Therapieansprechen) korreliert.

#### **4.1.1 Ermittlung der Genotypverteilung**

##### **4.1.1.1 Amplifizierung des Exons 8 des *MLH1*-Gens**

Zur Untersuchung der Patienten auf den vorliegenden Genotyp wurde das gesamte Exon 8 des *MLH1*-Gens mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das 381 bp lange Amplifikat mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Abbildung 5 zeigt exemplarisch an fünf Patientenproben die gelelektrophoretische Auftrennung des erfolgreich amplifizierten Exons 8. In jeder PCR wurde eine Negativkontrolle angesetzt, der keine DNA zugefügt wurde, um Kontaminationen zu detektieren. In dieser Weise wurden die Amplifikate des Exons 8 des *MLH1*-Gens für alle untersuchten Personen (n=107) nachgewiesen.

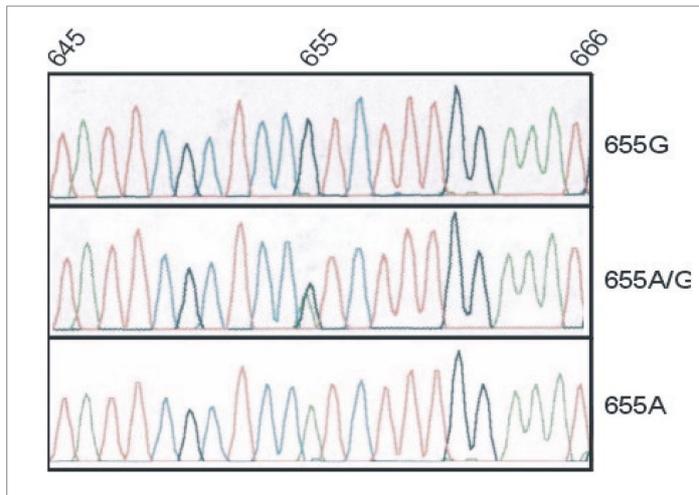


**Abbildung 5** Gelelektrophorese von Exon 8 des *MLH1*-Gens  
 Das mittels PCR erfolgreich amplifizierte Exon 8 wurde in einem 2% Agarosgel aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid und anschließender UV-Transilluminations sichtbar gemacht. Als DNA-Längenstandard wurde der DNA Molecular Weight Marker XIV verwendet, der die Größenordnung von Fragmenten mit einer Länge von 100 bis 2642 bp erlaubt.

#### 4.1.1.2 Auswertung der Sequenzierung

Zum Beurteilen von Veränderungen in der Sequenz des Exons 8 von *MLH1* wurden beide DNA-Stränge der PCR-Produkte sequenziert. Als Referenz für den Wildtyp wurde die Sequenz aus der elektronischen NCBI-Datenbank (Zugangsnummer: U40967) herangezogen. Bei der zu evaluierenden Veränderung handelt es sich um einen Basenaustausch an Position 655 des *MLH1*-Gens. In der Wildtypsequenz befindet sich an dieser Stelle die Base Adenosin (Genotyp:AA). Befindet sich in einem der beiden Allele Guanin, so liegt ein heterozygoter Genotyp (AG) vor. Ein Austausch in beiden Allelen führt zu einem homozygoten Genotyp (GG). Auf Proteinebene führt 655 A>G zu einem Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Valin (I219V) im MLH1-Protein.

Abbildung 6 zeigt Ausschnitte aus Sequenzdiagrammen der drei verschiedenen Genotypen. Im Elektropherogramm ist die Base Adenosin (A) grün, die Base Guanin schwarz dargestellt. Da der Wildtyp in beiden Allelen die Base Adenosin aufweist, zeigt sich im Sequenzabschnitt eine grüne Kurve an Position 655. Bei der homozygoten Form kann man an dieser Stelle eine schwarze Kurve sehen, welche anzeigt, dass in beiden Allelen Guanin vorliegt. Im Gegensatz dazu sieht man bei der heterozygoten Variante zwei sich überlagernde Kurven. Alle Patientenproben (n=107) wurden in dieser Weise sequenziert und auf den vorliegenden Genotyp untersucht.



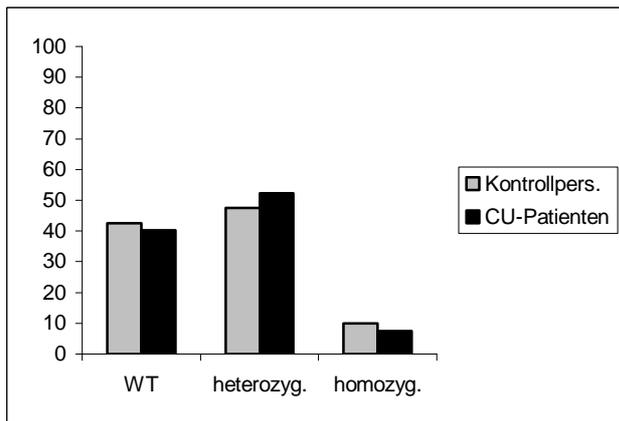
**Abbildung 6** Sequenzausschnitte von Exon 8  
Adenosin (A) grün, die Base Guanin (G) schwarz dargestellt. Beim homozygoten Genotyp (GG) zeigt sich an Position 655 in beiden Allelen Guanin; der heterozygote Genotyp (AG) hat an dieser Stelle sowohl Adenosin als auch Guanin und der Wildtyp weist in Position 655 lediglich Adenosin auf.

#### 4.1.2. Genotyphäufigkeiten

Sowohl in der Colitis ulcerosa-Gruppe als auch im Vergleichskollektiv zeigte sich am häufigsten der heterozygote Genotyp (AG). Von den insgesamt 67 untersuchten CU-Patienten lag die Heterozygotenhäufigkeit bei 35 Personen (entspricht 52%). In der Kontrollgruppe waren von 40 Untersuchten 19 (= 47,5%) heterozygot. Der am schwächsten vertretene Genotyp war in beiden Gruppen der homozygote Genotyp GG (5 CU-Patienten (=10%) vs. 4 Kontrollpersonen (=7,5%)) (Tabelle 3, Abbildung 7). Insgesamt unterschieden sich die beiden Gruppen bezüglich der Genotypverteilung nicht signifikant von einander ( $p=0,870$ ).

		Genotyp			Gesamt
		AA	AG	GG	
Pat_Gruppe	CU	27	35	5	67
	Kontrolle	17	19	4	40
Gesamt		44	54	9	107

**Tabelle 3** Genotypenverteilung bei CU-Patienten und Kontrollpersonen ( $p=0,870$ )



**Abbildung 7** Genotypverteilung in % ( $p=0,870$ )

### 4.1.3 Geschlechtsverteilung

Bezogen auf alle Teilnehmer, unabhängig von ihrem Status als Kontrolle oder Patient überwogen die Männer mit 56 Personen (52%) leicht gegenüber den Frauen mit 51 Personen (48%) (Tabelle 4). Zwischen den Geschlechtern zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Genotypverteilung ( $p=0,687$ ).

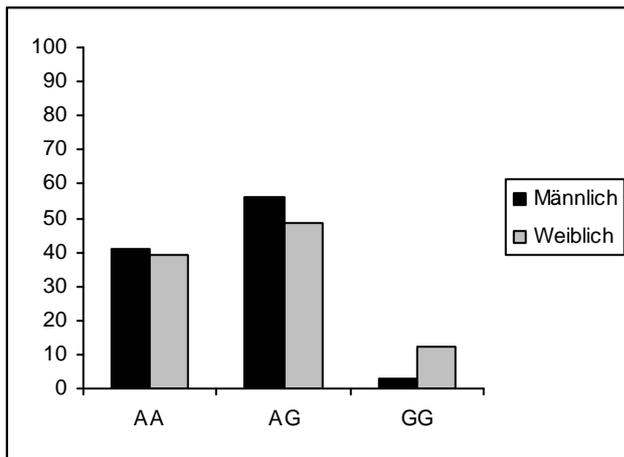
		Genotyp			Gesamt
		AA	GA	GG	
Geschlecht	weiblich	19	27	5	51
	männlich	25	27	4	56
Gesamt		44	54	9	107

**Tabelle 4** Genotypverteilung bezogen auf die Geschlechtsverteilung insgesamt ( $p=0,687$ )

In der Colitis-ulcerosa-Gruppe war das Verhältnis von Männern zu Frauen gleich verteilt. Von den insgesamt 67 untersuchten Patienten waren 33 Personen (49%) weiblich und 34 (51%) männlich. Sowohl bei den Männern als auch bei den Frauen zeigte sich der heterozygote Genotyp am häufigsten und es ließ sich, bezogen auf die Genotypverteilung, kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern erkennen ( $p=0,663$ ) (Tabelle 5, Abbildung 8).

		Genotyp			Gesamt
		AA	AG	GG	
Geschlecht	weiblich	13	16	4	33
	männlich	14	19	1	34
Gesamt		27	35	5	67

**Tabelle 5** Genotypverteilung der Männern und Frauen mit CU (p=0,663)



**Abbildung 8** Genotyp bezogen auf die Geschlechtsverteilung in der CU-Gruppe (p=0,663)

#### 4.1.4 Alter der Patienten und Alter bei Erstdiagnose

Die Colitis ulcerosa-Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Durchschnitt 42 Jahre alt, wobei der jüngste Patient 21 Jahre und der älteste 83 Jahre war. Das Alter bei der Erstdiagnose lag im Mittel bei 34 Jahren (7-80 Jahre) (Tabelle 6).

		Alter	Alter_bei_ED
N	Gültig	67	64
	Fehlend	0	3
Median		42	34
Minimum		21	7
Maximum		83	80

**Tabelle 6** Alter und Alter bei Erstdiagnose

Bezogen auf den Altersmedian von 34 Jahren zeigte sich bei Einteilung der Gruppen in Patienten deren Erstdiagnose vor dem 34 Lebensjahr und solchen bei denen die Erstdiagnose nach dem 34 Lebensjahr gestellt wurde bezüglich der Genotypverteilung kein signifikanter Unterschied ( $p=0,527$ ) (Tabelle 7).

	Genotyp			Gesamt
	AA	GA	GG	
Alter_bei_ED bis 34	12	18	3	33
über 34	14	17	0	31
Gesamt	26	35	3	64

**Tabelle 7** Genotypverteilung bezogen auf Alter bei Erstdiagnose bezogen auf den Altersmedian ( $p=0,527$ )

Das Durchschnittsalter im Vergleichskollektiv betrug 55 Jahre, wobei die jüngste Person 19 Jahre alt war und die älteste 75 Jahre (Tabelle 8)

		Alter
N	Gültig	40
	Fehlend	0
	Median	55
	Minimum	19
	Maximum	75

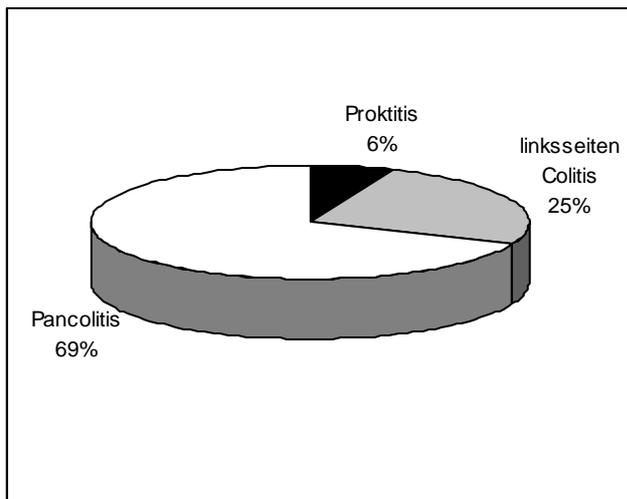
**Tabelle 8** Alter der Kontrollpersonen

#### 4.1.5 Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung

Von den insgesamt 67 untersuchten Colitis ulcerosa-Patienten hatten 46 Patienten (69%) eine Pancolitis, 17 Patienten (25%) eine linkseitigen Colitis und lediglich 4 Patienten (6%) eine Proktitis (Tabelle 9, Abbildung 9)

		Häufigkeit	Prozent
Gültig	Proktitis	4	6,0
	linksseitige Colitis	17	25
	Pancolitis	46	69
	Gesamt	67	100,0

**Tabelle 9** Lokalisation und Ausdehnung der Erkrankung



**Abbildung 9** Lokalisation und Ausdehnung in %

In der Gruppe der Patienten mit Proktitis überwog leicht der Wildtyp (2 Patienten) gegenüber heterozygotem (1 Patient) und homozygotem Genotyp (1 Patient)). In den anderen beiden Gruppen lag der heterozygote Genotyp am häufigsten vor (9 bzw. 25 Patienten) (Tabelle 10). Insgesamt erwiesen sich die Unterschiede in den Genotypverteilungen jedoch als nicht signifikant ( $p=0,731$ ).

		Genotyp			Gesamt
		AA	AG	GG	
Befall	Proktitis	2	1	1	4
	linksseitige Colitis	7	9	1	17
	Pancolitis	18	25	3	46
Gesamt		27	35	5	67

**Tabelle 10** Genotypverteilung bezogen auf die Lokalisation und Ausdehnung ( $p=0,731$ )

### 4.1.6 Therapie

35 Patienten (52%) des untersuchten Kollektivs wurden mit Immunsuppressiva behandelt. 22 (33%) Patienten waren mit 5-ASA- oder Steroidtherapie behandelt worden und nur ein kleiner Teil von 10 Patienten (15%) hatte sich einer operativen Therapie unterziehen müssen (Abbildung 10).

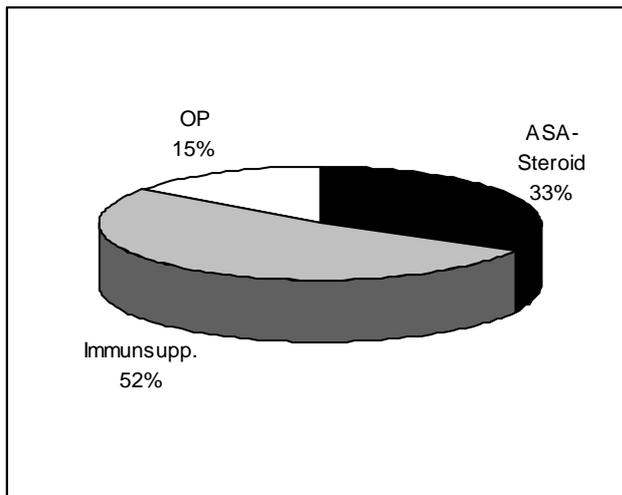


Abbildung 10 Therapie in %

In der Gruppe der immunsuppressiv oder operativ behandelten Personen zeigte sich der heterozygote Genotyp am häufigsten (21 bzw. 6 Patienten). Bei der 5-ASA-/Steroid-Gruppe überwog marginal der Wildtyp (11 Patienten). Seltenster Genotyp war in allen drei Gruppen die homozygote Variante. Bei den operativ behandelten Patienten lag bei keinem der Untersuchten ein homozygoter Genotyp vor (Tabelle 11). Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen konnten nicht festgestellt werden ( $p=0,310$ ).

		Genotyp			Gesamt
		WT	heterozygot	homozygot	
Therapie	ASA_Steroide	11	8	3	22
	Immunsuppressiva	12	21	2	35
	OP	4	6	0	10
Gesamt		27	35	5	67

Tabelle 11 Genotypverteilung bezogen auf die Therapie ( $p=0,310$ )

Auch beim Vergleich der ASA-Steroidgruppe mit Patienten, die aufgrund eines steroidrefraktären Krankheitsverlauf bzw. mehr als 2 Krankheitsschüben pro Jahr mit Immunsuppressiva oder operativer Therapie behandelt werden mussten, zeigte sich bezüglich der Genotypverteilung kein signifikanter Unterschied ( $p=0,122$ ) (Tabelle 12).

		Genotyp			Gesamt
		WT	heterozygot	homozygot	
Therapie_2	ASA_Steroide	11	8	3	22
	IS oder OP, "refraktär"	16	27	2	45
Gesamt		27	35	5	67

**Tabelle 12** Genotypverteilung bei Patienten mit ASA-Steroid- und steroidrefraktärer Therapie ( $p=0,122$ )

Die Patienten, die aufgrund ihres steroidrefraktären oder steroidabhängigen Krankheitsverlaufes mit Immunsuppressiva oder mit einer Operation therapiert werden mussten, überwogen mit 45 Personen (69%) gegenüber der Patientengruppe, die lediglich einer 5-ASA-oder Steroidtherapie bedurften.

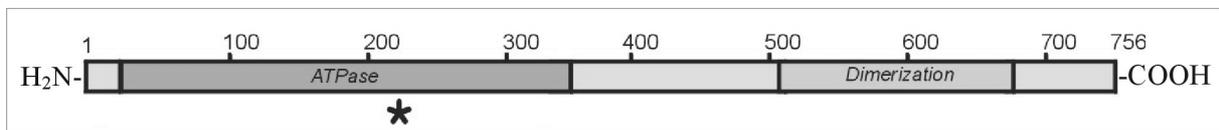
## 4.2 Rolle von I219 für die MLH1-Funktion

Um zu analysieren, inwieweit sich der I219V-Polymorphismus auf die Funktion von MLH1 auswirkt, wurde zunächst die potentielle Rolle von I219 für die MLH1-Funktion untersucht. Hierzu wurden bioinformatische Methoden angewandt.

## 4.2.1 Position von I219 innerhalb der strukturellen und funktionellen Einheit des MLH1-Proteins

Das MLH1-Protein besteht insgesamt aus 756 Aminosäuren. Der N-terminale Bereich des Proteins ist stark konserviert und enthält eine ATPase-Domäne (von AS 1 bis AS 335), die entscheidend an der Reparaturfunktion von MLH1 beteiligt ist (Raschle *et al.*, 2002). Im variablen C-terminalen Bereich befindet sich die Dimerisierungsdomäne, welche bei der Interaktion von MLH1 mit PMS2 eine wichtige Rolle spielt (Abbildung 11).

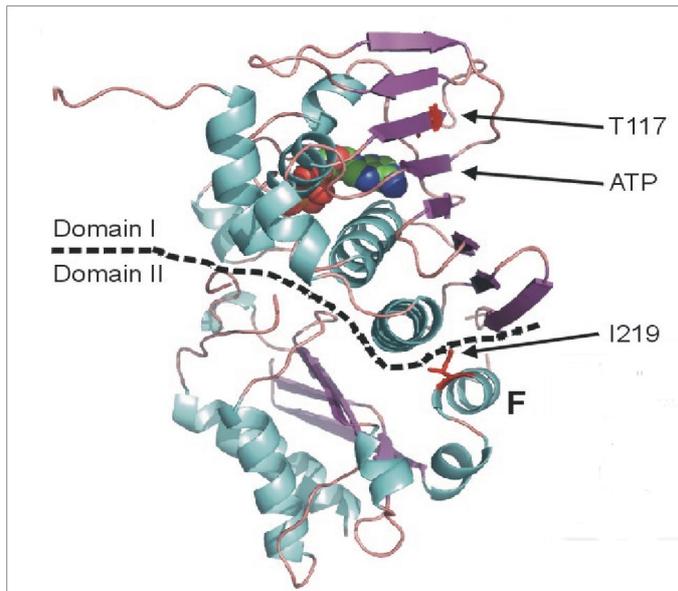
I219 ist im konservierten N-terminalen Bereich innerhalb der ATPase-Domäne lokalisiert.



**Abbildung 11** Struktur des MLH1-Proteins

Strukturell besteht MLH1 aus einer konservierten N-terminalen ATPase-Domäne und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne. I219 liegt innerhalb der ATPase-Domäne (siehe \*)

Abbildung 12 zeigt ein Homologiemodell der ATPase-Domäne des humanen MLH1, welches auf der Grundlage der Kristallstruktur des MLH1-homologen bakteriellen (*E.coli*) MutL (Ban & Yang, 1998) (Protein Data Bank (PDB): 1B62) errechnet wurde. Der ATPase-Bereich des Proteins setzt sich aus zwei jeweils aus  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern bestehenden Domänen zusammen, die über eine  $\alpha$ -Helix (F) miteinander verbunden sind. Die erste Domäne enthält die Nukleotidbindungstasche, die sowohl für die Bindung als auch für die Hydrolyse des ATPs verantwortlich ist. Man weiß, dass Mutationen im Bereich der ATP Bindungsstelle, die z.B. beim Lynch Syndrom zu finden sind (T117M), die DNA Reparaturfunktion des MLH1-Proteins beeinträchtigen. Die katalytisch relevante zweite Domäne steht der ersten ellenbogenartig in einem Winkel gegenüber. Beim bakteriellen MLH1-Homologen MutL wurde beobachtet, dass die Bindung von ATP zu umfangreichen Konformationsänderungen im Protein führt. Die beiden Domänen rotieren dabei gegeneinander (Ban *et al.*, 1999), wodurch sich die Innenflächen näher kommen. Bei genauer Betrachtung der Struktur des MLH1-Proteins sieht man, dass I219 innerhalb der Helix lokalisiert ist, die Domäne I mit Domäne II der ATPase verbindet. Das betreffende Isoleucin ist hierbei ins Proteininnere innerhalb des Verbindungsbereiches der beiden Domänen gerichtet und hat somit wahrscheinlich kaum Kontakt mit der Hydrathülle an der Proteinoberfläche.



**Abbildung 12** Homologiemodell der ATPase-Domäne von MLH1.

Das Modell wurde basierend auf der Kristallstruktur des MLH1-homologen *E.coli* MutL (PDB: 1B62, Sequenzübereinstimmung: 35%) generiert und graphisch mittels PyMol Molecula Graphic System (<http://www.pymol.org>) dargestellt. Die Abbildung zeigt die beiden aus  $\alpha$ -Helices (blau dargestellt) und  $\beta$ -Faltblättern (violett dargestellt) bestehenden Domänen der ATPase und die Nukleotidbindungstasche (dargestellt mit gebundenem ADP), die in Domäne I lokalisiert ist. I219 (rot dargestellt) liegt innerhalb der Helix (F), welche Domäne I mit Domäne II verbindet.

#### 4.2.2 Mögliche Konsequenzen des Austauschs von Isoleucin nach Valin

Wie Isoleucin gehört auch Valin zu den hydrophoben Aminosäuren, die typischerweise zur Innenseite von Proteinen hin orientiert sind, so auch in MLH1. Die durch solche Aminosäuren vermittelten hydrophoben Wechselwirkungen tragen zur strukturellen Integrität von Proteinen bei. In ihrem Aufbau unterscheiden sich die beiden Aminosäuren lediglich in einer um eine Methylengruppe verlängerten aliphatische Seitenkette bei Isoleucin (Abbildung 13 und Abbildung 14).

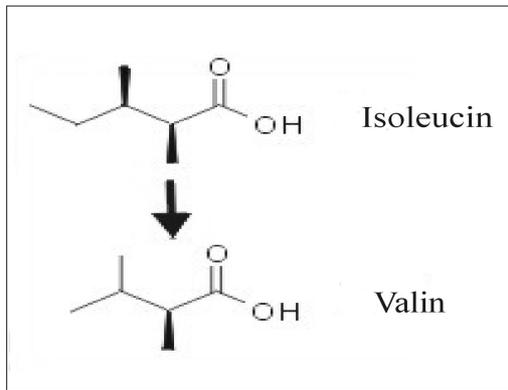


Abbildung 13 Vergleich Isoleucin vs. Valin

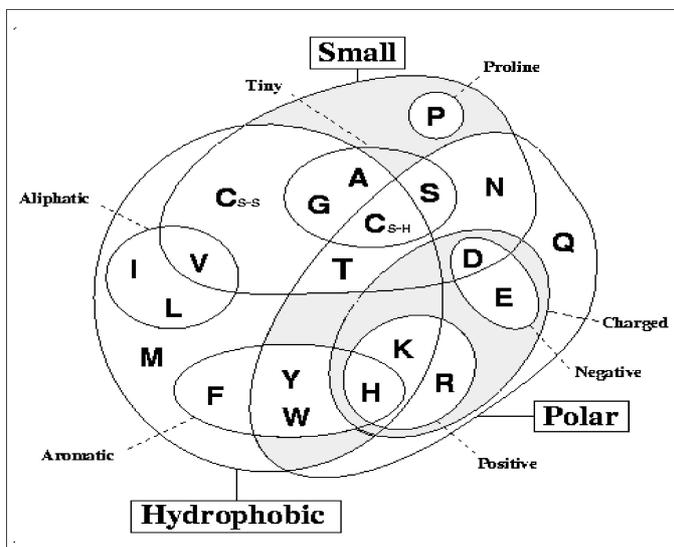
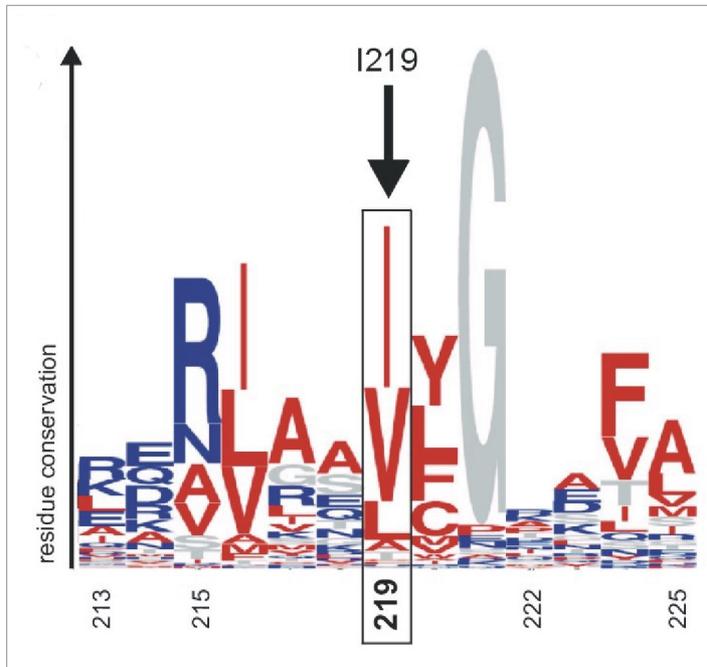


Abbildung 14 Allgemeine Klassifikation von Aminosäuren

### 4.2.3 Sequenzalignment von MLH1-I219

Das multiple lokale Sequenzalignment von MLH1-I219 und dessen unmittelbare Umgebung ist als Weblogopräsentation in Abbildung 15 dargestellt. Hydrophile Aminosäureresiduen sind blau, hydrophobe rot und alle anderen in grau dargestellt. Die Größe der jeweiligen Spalte zeigt an wie stark die jeweilige Position konserviert ist, d.h. je stärker die Konservierung desto höher ist die Spalte. Die Größe der Buchstaben gibt an wie häufig die einzelnen Aminosäuren auf der entsprechenden Position vorkommen. Je häufiger sie vorkommen desto größer sind die Buchstaben dargestellt.

In der Abbildung sieht man, dass Position 219 relativ stark konserviert ist. Am häufigsten findet man an dieser Stelle Isoleucin, dicht gefolgt von Valin. Andere kleine alipathische Aminosäureresiduen wie Leucin und Alanin kommen auf Position 219 seltener vor.



**Abbildung 15** Multiples lokales Sequenzalignment von MLH1-I219

In der Weblogopresentation (generiert mittels <http://weblogo.berkeley.edu/>) sind hydrophile Aminosäureresiduen blau, hydrophobe rot und alle anderen grau dargestellt. Die Größe der Spalten gibt an wie stark die jeweilige Position konserviert ist, die Größe der Buchstaben spiegelt die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren auf der entsprechenden Position wider.

### 4.3 Auswirkung des MLH1-I219V Polymorphismus auf die DNA-Mismatch-Reparaturfunktion

Die Hauptfunktion von MutL $\alpha$  besteht darin, die genetische Integrität zu wahren. Zur Erfüllung dieser Aufgabe ist das Heterodimer MutL $\alpha$  (bestehend aus PMS2 und MLH1) ganz entscheidend an der DNA-Mismatch-Reparatur beteiligt. Bei der Mismatch-Reparatur werden fehlgepaarte oder ungepaarte Nukleotide nach erfolgter DNA-Replikation erkannt und aus dem fehlerhaften DNA-Strang entfernt. Eine Keimbahnmutation in einem DNA-Reparaturgen (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *MSH6*), welche die Reparaturfähigkeit entscheidend stört, führt zum

Lynch-Syndrom. Da zwischen dem Auftreten von MLH1-I219V und dem Lynch-Syndrom allerdings kein nachgewiesener Zusammenhang besteht, kann man davon ausgehen, dass die Alteration die Funktion von MLH1 nicht vollständig inaktiviert. Um genau zu quantifizieren, inwieweit der Polymorphismus I219V die Reparaturfunktion von MLH1 beeinträchtigt, wurden biochemische Methoden angewandt.

### **4.3.1 Expression der MLH1-Proteine**

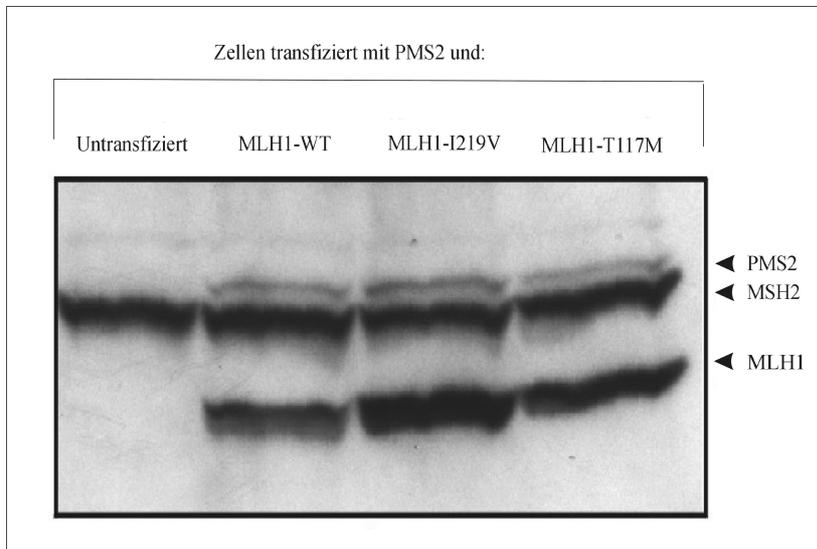
HEK293T-Zellen, welche dazu in der Lage sind MutS $\alpha$ , nicht aber MutL $\alpha$  zu exprimieren, wurden mit PMS2- und unterschiedlichen MLH1-Plasmiden cotransfiziert. Die rekombinanten MLH1-Plasmide trugen entweder MLH1-I219V, den MLH1-Wildtyp oder die MLH1-Mangelmutante T117M, die beim Lynch-Syndrom gefunden wurde und nachgewiesenerweise zu einer weitgehenden Funktionseinschränkung des Reparaturproteins führt. Für die Transfektion wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass das Verhältnis der Plasmide, die in den ausgefällten Calciumphosphat-Kristallen enthalten sind, genau dem Verhältnis entspricht, mit welchem die beiden Plasmide in der Lösung angesetzt wurden. Dieses Verhältnis findet sich dann auch in den exprimierten Proteinen wieder. Für die Cotransfektion von PMS2- und MLH1-Plasmiden ist es von Vorteil, wenn beide in gleichen Anteilen exprimiert werden, da sie zusammen als Heterodimer arbeiten.

Aus den Zellen wurden 24-48 Stunden nach Transfektion native Gesamtproteinextrakte hergestellt. Da bei dieser sanften Extraktionsmethode keine Tenside verwendet werden, bleibt die Funktion der Proteine gut erhalten. Dies ist unabdingbar, da im weiteren Prozedere gerade die Proteinfunktion ermittelt werden soll.

Die Expression der transfizierten MutL $\alpha$ -Heterodimere wurde anschließend mittels SDS-Page und Westernblot überprüft (Abbildung 16).

Als Kontrolle wurde in jedem Versuch ein Teil der Zellen nicht transfiziert. Da die HEK-Zellen das MutL $\alpha$  wie bereits erwähnt nicht selbst synthetisieren können, zeigte sich bei diesen Zellen lediglich die Proteinbande des endogen gebildeten MSH2 entspricht. Bei den Zellen, die mit PMS2- und MLH1-Plasmiden cotransfiziert wurden, sind zusätzliche Banden sichtbar. Zwischen den drei unterschiedlichen MLH1-Plasmiden (MLH1-Wildtyp, MLH1-I219V, MLH1-T117M) ließ sich bezüglich der Proteinexpression kein Unterschied erkennen.

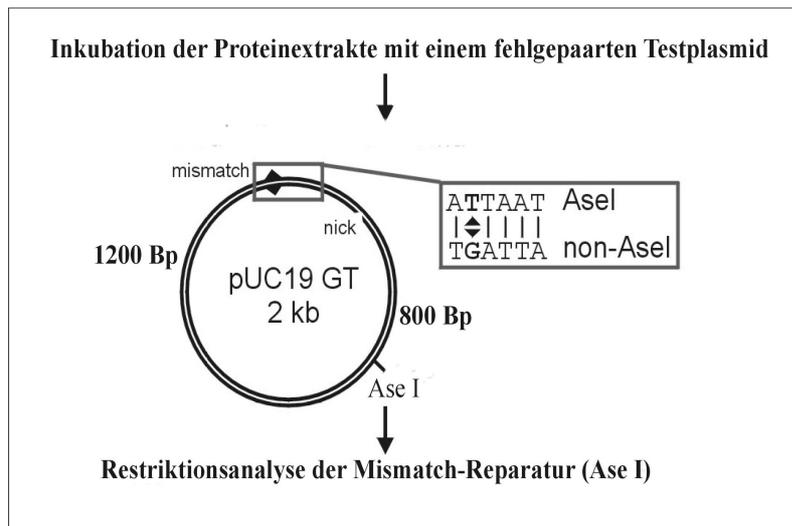
Hieraus lässt sich schließen, dass die Alteration I219V mit großer Wahrscheinlichkeit zu keiner Beeinträchtigung der Proteinstabilität führt.



**Abbildung 16** Expression von MutL $\alpha$  nach Transfektion  
HEK293T Zellen wurden mit den MutL $\alpha$  Untereinheiten PMS2 und entweder MLH1-WT, MLH1-I219V oder MLH1-T117M cotransfiziert. Native Gesamtproteinextrakte wurden hergestellt und die Expression der transfizierten MutL $\alpha$ -Heterodimere durch Auftrennung von 50  $\mu$ g Extrakt mittels SDS-Page und anschließendem Immunblot kontrolliert. Beide MutL $\alpha$ -Untereinheiten (MLH1 und PMS2) konnten analog des endogen gebildeten MSH2s, welches als Laufkontrolle diente, detektiert werden.

### 4.3.2 Überprüfung der MLH1-Mismatch-Repair-Funktion

Anhand eines *in vitro* DNA-Mismatch-Reparatur-Assays (MMR-Assay) wurde überprüft, ob der Polymorphismus I219V zu einer Beeinträchtigung der Reparaturaktivität des MLH1-Proteins führt. Hierzu wurden die Proteinextrakte der transfizierten 293T-Zellen mit einem Testplasmid inkubiert, welches zwei Voraussetzungen erfüllte: 1. Das Plasmid wies zwei *AseI* Restriktionsstellen auf, von denen eine die Basenfehlpaarung G-T enthielt und 2. war ein Einzelstrangbruch (=nick) in dem Strang vorhanden, der von der Reparaturmaschinerie repariert werden soll. Die Restriktionsendonuklease *Ase I* erkennt und schneidet nur Sequenzen mit der Basenabfolge TAATTA (Abbildung 17).



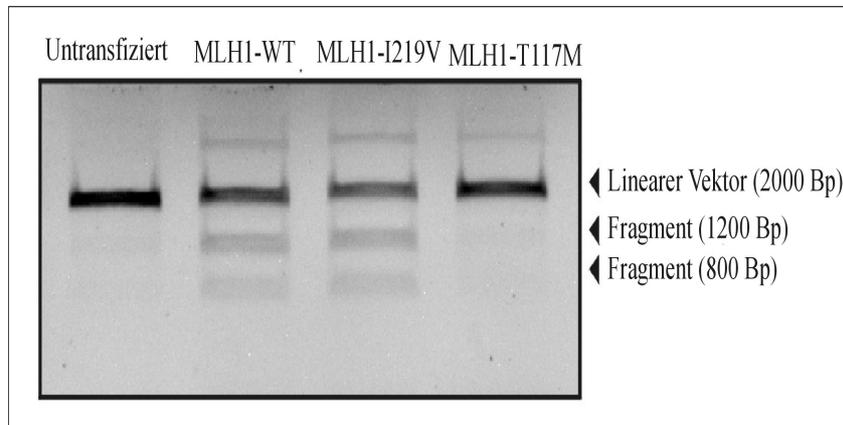
**Abbildung 17** Schematische Darstellung des MMR-Assay

Die Extrakte der transfizierten Zellen wurden 20 min bei 37°C mit einem fehlgepaarem Testplasmid inkubiert. Der Einzelstrangbruch (=nick) innerhalb des Plasmids zeigt der Mismatchreparatur den Strang an, der das fehlgepaarte Guanin enthält und durch den Austausch mit Adenin repariert werden soll. Der daraus resultierende korrekt gepaarte DNA-Doppelstrang, weist somit eine neue, zweite *Ase I* Restriktionsstelle auf, so dass nach der Zugabe des Restriktionsenzym neue DNA-Fragmente entstehen, die eine erfolgreiche Mismatchreparatur anzeigen.

Wenn die Reparaturaktivität von MutL $\alpha$  intakt ist und die G-T Fehlbasenpaarung erkannt und das fehlgepaarte Guanin durch Adenin ersetzt wird, schneidet *Ase I* das Plasmid an zwei Stellen, so dass zwei Fragmente entstehen. Diese können mittels Agarosegelelektrophorese nachgewiesen werden. Ist MutL $\alpha$  nicht dazu in der Lage, die Reparatur der Basenfehlpaarung adäquat zu unterstützen, erkennt und schneidet *Ase I* das Plasmid nur an der fehlerfreien zweiten Restriktionsstelle. Dadurch entsteht nur ein einziges Fragment (der linearisierte Vektor), das als einzelne Bande in der Gelelektrophorese nachweisbar ist.

Abbildung 18 zeigt, dass die Proteinextrakte der 293T-Zellen, welche mit dem MutL $\alpha$ -Wildtyp transfiziert wurden, die G-T-Fehlpaarung erkannt und repariert haben (die zwei Reparaturbanden sind sichtbar). Ebenso effektiv wie der Wildtyp in der Korrektur der Basenfehlpaarung erwies sich der MutL $\alpha$ <sup>MLH1 I219V</sup>-Polymorphismus. Extrakte aus Zellen, die nicht transfiziert wurden, konnten die fehlerhaft gepaarten Basen nicht reparieren (es entsteht nur die Bande des linearisierten Vektors). Auch die beim Lynch-Syndrom auftretende T117M-Mangelmutante, die zu einem kompletten Verlust der Reparaturfähigkeit führt, war nicht dazu in der Lage, den Austausch des fehlgepaarten Guanin durch ein korrektes Adenin zu unterstützen. Dieses Experiment zeigte, dass der Polymorphismus I219V nicht zu einem

vollkommenen Ausfall der Mismatch-Reparatur führt, so wie dies bei Mutationen im Lynch-Syndrom meist zu beobachten ist

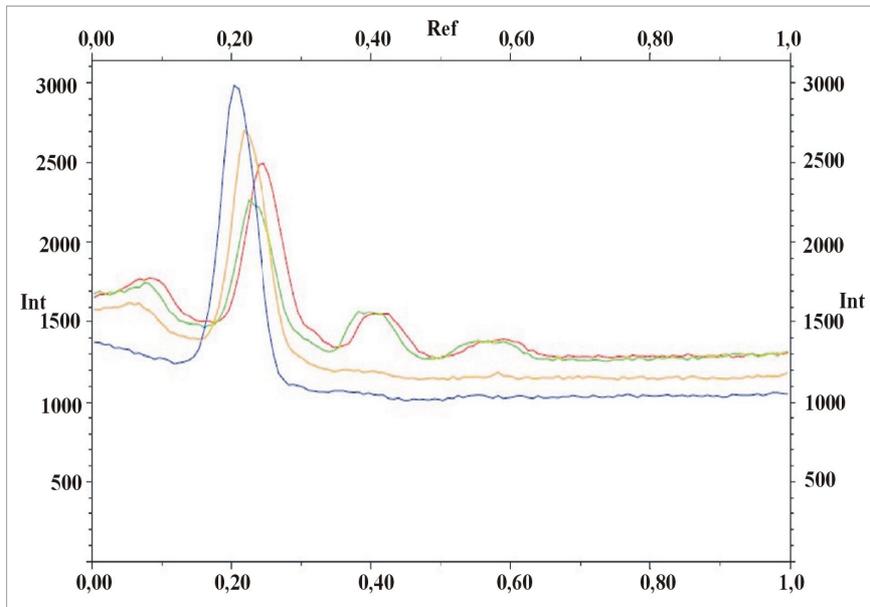


**Abbildung 18** Restriktionsanalyse der Mismatch-Reparatur

Das Testplasmid wurde nach der Inkubation isoliert, aufgereinigt und anschließend mit *Ase I* 1h bei 37 inkubiert. Die entstanden Fragmente wurde in einem 2% Agarosogel aufgetrennt und durch Zugabe von Ethidiumbromid und anschließender UV-Transillumination sichtbar gemacht.

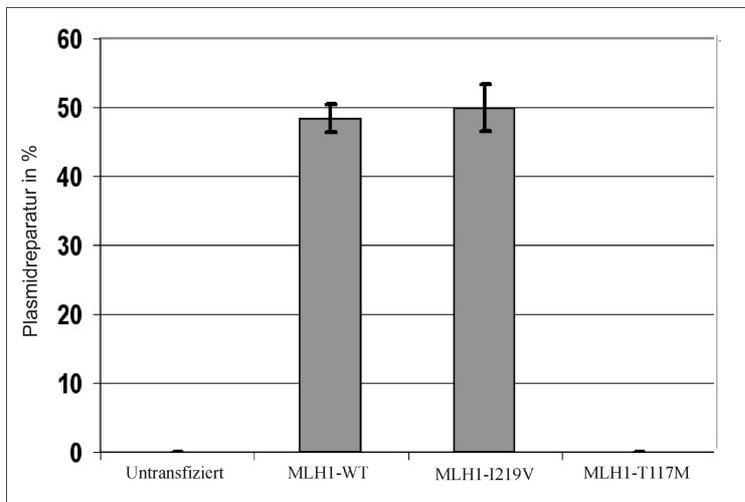
Um die Reparaturaktivität der unterschiedlichen Proteine aber anschließend genauer bestimmen zu können, wurde die Menge an entstandenen linearen Vektoren und Fragmenten quantitativ gemessen. Hierzu wurde das Quantifizierungsprogramm Quantity One der Firma BioRad verwendet. Insgesamt wurden Daten aus drei verschiedenen Versuchen zur Berechnung der durchschnittlichen Anteile reparierter Plasmide verwendet (Abbildung 19). Die ermittelte Standardabweichung wurde graphisch durch Einzeichnung von Fehlerbalken (=error bars) dargestellt.

Bei Betrachtung der Abbildung 20 sieht man, dass sich die DNA-Reparaturaktivität des MLH1-Wildtyps nicht signifikant von der Reparaturfähigkeit des MLH1-I219V Polymorphismus unterscheidet ( $48,4\% \pm 2,1\%$  beim Wildtyp vs.  $49,9\% \pm 3,45\%$  bei MLH1-I219V). Die geringfügig höhere Reparaturaktivität des I219V-Polymorphismus ist statistisch nicht signifikant. Sowohl das veränderte als auch das Wildtyp-MLH1 erkennen und reparieren die G-T-Basenfehlbildung ohne erkennbaren Unterschied in der Effektivität. Im Gegensatz dazu konnten weder bei den untransfizierten Zellen noch bei der T117M-Mangelmutante quantitativ reparierte Plasmide nachgewiesen werden.



**Abbildung 19** Quantifizierung der Reparaturbanden

Die Flächen unter den Kurven wurden gemessen. Die Reparatur wurde ermittelt als Quotient der Reparaturbanden zur Fläche aller Banden. Die blaue Kurve entspricht den untransfizierten Zellen, die grüne dem Wildtyp, rot steht für die MLH1-I219V Alteration, die gelbe Kurve entspricht der MLH1-T117M Mangelmutante.



**Abbildung 20** Quantifizierung der Reparaturaktivität

Die Quantität der linearisierten Vektoren und Fragmente wurde mit Hilfe der Quantity One Software der Firma BioRad gemessen. Die durchschnittlichen Anteile reparierten Plasmids wurden in drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an.

## 5. Diskussion

Das Mismatch-Reparaturgen *MLH1* liegt im IBD9-Locus, einer Suszeptibilitätsregion für chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Annese *et al.*, 2002b; Pokorny *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde in der Kolonmukosa von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen Mikrosatelliteninstabilität gefunden, die ein charakteristisches Merkmal für Replikationsfehler im Rahmen einer nicht intakten DNA-Mismatch-Reparatur ist. Diese ist die Konsequenz eines Ausfalls des *MLH1*-Gens.

Die italienische Forschergruppe um Bagnoli fand einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer bestimmten Keimbahnveränderung im *MLH1*-Gen (dem Polymorphismus *MLH1*-655A>G (MLH1-I219V)) und dem Auftreten der Colitis ulcerosa (Bagnoli *et al.*, 2004). Eine der von Bagnoli *et al.* postulierten Möglichkeiten, wie es durch den *MLH1*-655 A>G Polymorphismus zu der signifikanten Assoziation mit der Erkrankung kommen könnte, ist eine Funktionseinschränkung des MLH1-Proteins infolge dieser genetischen Alteration.

Das Ziel dieser Arbeit bestand nun darin, den von Bagnoli *et al.* postulierten Zusammenhang zwischen der 655A>G-Alteration und der Colitis ulcerosa zu bewerten und zu untersuchen, ob der MLH1-I219V Polymorphismus tatsächlich zu einer Funktionseinschränkung des MLH1-Reparaturproteins führt. Hierzu wurden Colitis ulcerosa-Patienten und gesunde Vergleichspersonen auf das Vorliegen des MLH1-I219V Polymorphismus hin untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe bioinformatischer und biochemischer Methoden überprüft, ob die genetische Alteration tatsächlich zu einer Funktionsänderung des MLH1-Proteins führt.

Theoretisch könnte MLH1-I219V auf zwei verschiedene Arten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zusammenhängen (Bagnoli *et al.*, 2004):

1) Die infolge des Polymorphismus veränderte Aminosäuresequenz könnte zu einer *direkten* Beeinträchtigung der Proteinfunktion führen und dadurch die Krankheitsentstehung fördern bzw. den Krankheitsverlauf verändern.

2) Andererseits wäre es auch denkbar, dass die MLH1-I219V Alteration *indirekt* mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert ist. So könnte es z.B. sein, dass das *MLH1*-Gen in einem Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium) mit einer anderen Alteration steht, welche funktionell für Manifestation und Verlauf der Erkrankung verantwortlich sein könnte. Diese andere Alteration könnte entweder innerhalb des *MLH1*-Gens lokalisiert sein

(und sich somit auf die DNA-Mismatch-Reparatur auswirken) oder in einem Gen liegen, das sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu *MLH1* befindet und eine andere biologische Funktion beeinträchtigt, die nichts mit der DNA-Mismatch-Reparatur zu tun hat.

## **5.1 Vorkommen des *MLH1*-I219V Polymorphismus bei Patienten mit Colitis ulcerosa**

### **5.1.1 Zusammenhang zwischen der Genotypverteilung und der refraktären Colitis ulcerosa**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 107 Personen auf das Vorliegen des *MLH1*-655 A>G Polymorphismus untersucht. 67 der 107 Personen litten an Colitis ulcerosa, die restlichen 40 waren gesunde Vergleichspersonen, ohne anamnestische oder klinische Hinweise auf eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung. Das Untersuchungskollektiv von Bagnoli *et al.* umfasste insgesamt 201 Colitis ulcerosa-Patienten und 126 gesunde Kontrollpersonen und war damit etwas größer als unser Untersuchungskollektiv, wobei der Anteil der refraktären Colitis ulcerosa-Patienten, deren Auftreten laut Bagnoli *et al.* mit dem I219V-Polymorphismus zusammenhängt, lediglich 20,4% der insgesamt untersuchten Colitis ulcerosa-Patienten ausmachte. Da in unserer Studie die meisten (67,2%) der Colitis ulcerosa-Patienten eine refraktäre Verlaufsform zeigten und ein signifikanter Zusammenhang zwischen der I219V-Alteration und der Colitis ulcerosa lediglich für diese Subgruppe der Patienten nachgewiesen werden konnte, erwies sich unser kleineres Untersuchungskollektiv bezüglich des gefundenen Zusammenhangs letztendlich als größer.

Bezüglich der Genotypverteilung zwischen Colitis ulcerosa-Patienten und gesunden Vergleichspersonen konnten weder in unserer Studie noch bei Bagnoli *et al.* signifikante Unterschiede festgestellt werden. Häufigster Genotyp in Kontroll- und Patientengruppe war in beiden Studien der heterozygote Genotyp, dicht gefolgt vom Wildtyp. Am seltensten vertreten war sowohl bei uns als auch bei der italienischen Kohorte der homozygote Genotyp. Laut Bagnoli *et al.* ist die Wahrscheinlichkeit, an refraktärer Colitis ulcerosa zu leiden, bei Homozygoten 9,2-mal höher als bei heterozygoten Genotypen, bei denen die Wahrscheinlichkeit für eine refraktäre Form lediglich 0,3% beträgt. Die Zahl der Patienten

mit refraktärer Colitis ulcerosa war in unserer Analyse höher als in der Vorgängerstudie (45 vs. 41 Patienten). Laut Bagnoli *et al.* hatten 37% der Patienten mit refraktärer Colitis ulcerosa den homozygoten GG-Genotyp. Eine Testung von 40 Patienten und 40 Vergleichspersonen würde daher ausreichen, um die Assoziation mit 90%iger Sicherheit zu detektieren. Trotzdem fanden sich in den untersuchten Patienten nicht die von Bagnoli *et al.* zu erwartenden 37% (17 Patienten) des GG-Genotyps, sondern nur 4% [KI 95% (0,5%; 15,1%)]. Somit ist bewiesen, dass die genannte Assoziation entweder wesentlich schwächer ist als beschrieben oder dass sie auf bestimmte geographische Regionen begrenzt ist.

## **5.2 Analyse der Auswirkung von MLH1-I219V auf die DNA-Mismatch-Reparatur**

Um die Frage zu klären, ob die MLH1-I219V Alteration zu einer Funktionsänderung in MLH1 führt, haben wir die besagte Alteration mittels bioinformatischer Methoden näher untersucht.

### **5.2.1 Bioinformatisch-theoretische Betrachtung der I219V-Alteration**

Man weiß zwar, dass der I219V-Polymorphismus nicht zum Lynch-Syndrom führt, ein Zusammenhang mit der Colitis ulcerosa konnte bislang jedoch weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Bei Betrachtung der Struktur des MLH1-Proteins fällt auf, dass die I219V-Alteration im stark konservierten N-terminalen Bereich innerhalb der funktionell bedeutsamen ATPase-Domäne des Proteins lokalisiert ist. Die MLH1-ATPase besteht aus zwei Domänen, die über  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden sind. Mutationen innerhalb der Nukleotidbindungsdomäne, wie sie z.B. beim Lynch-Syndrom gehäuft auftreten, beeinträchtigen meist die Reparaturfunktion von MLH1.

Unsere Auswertung der Struktur von MLH1 ergab, dass I219V zwar nicht in der besonders häufig von inaktivierenden Mutation betroffenen Nucleotidbindungsdomäne lokalisiert ist, aber aufgrund ihrer Position durchaus trotzdem das reibungslose Ablaufen der Konformationsänderungen, die während des Reparaturprozesses stattfinden, stören könnte. Die Tatsache, dass andere HNPCC-Mutationen in der Nähe gefunden wurden (z.B. R217C,

R226L) unterstützt dies. Jedoch lässt die chemische Ähnlichkeit von Isoleucin und Valin vermuten, dass aus der Alteration I219V sehr wahrscheinlich keine gravierenden Effekte auf die Proteinfunktion zu erwarten sind. Dadurch, dass die I219V-Alteration an einer konservierten und auch funktionell bedeutsamen Position innerhalb des MLH1-Proteins liegt, kann ein gewisser Effekt auf Stabilität oder Funktion des Proteins jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

### **5.2.2 Biochemische Evaluierung der Auswirkung von MLH1-I219V auf die DNA-Mismatch-Reparatur**

Die biologische bedeutsamste bekannte Funktion des MLH1-Proteins ist seine Beteiligung an der postreplikativen DNA-Mismatch-Reparatur. Da ein kompletter Verlust der MLH1-Funktion durch die I219V-Alteration laut unserer bioinformatischen Analysen sehr unwahrscheinlich zu sein scheint, wollten wir genauer quantifizieren, ob und wenn, wie sehr die Reparatureffektivität von MLH1 durch den I219V-Polymorphismus herabgesetzt wird.

Hierzu verwendeten wir einen *in vitro* DNA-Mismatch-Reparatur-Assays (MMR-Assay), anhand dessen eine genaue Quantifizierung der Reparaturaktivität möglich ist.

Die Reparaturaktivität der MLH1-I219V Alteration ließ keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp erkennen, so dass eine direkte Beeinträchtigung der Proteinfunktion auch aus biochemischer Sicht relativ unwahrscheinlich ist.

### **5.2.3 Vergleich unserer Ergebnisse mit anderen Studien**

Dieses Ergebnis entspricht auch dem Ergebnis einer kürzlich erschienen finnischen Studie (Raevaara *et al.*, 2005). Raevaara *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit die Reparaturfähigkeit von 34 verschiedenen MLH1-Alterationen, darunter auch die MLH1-I219V Alteration. Wie in unserer Studie wurde hierzu ein *in vitro* DNA-Mismatch-Reparatur-Assay verwendet, bei dem die Reparaturaktivität der verschiedenen MLH1-Alterationen mit der Reparaturfähigkeit des MLH1-Wildtyps verglichen wurde. Als Grenze für eine normale Reparaturaktivität definierten Raevaara *et al.* Alterationen, die dazu in der Lage waren, mehr als 30% der Plasmide zu reparieren.

Wie in unserer Studie konnten zwischen der Reparaturaktivität der MLH1-I219V Alteration und der Reparaturreffektivität des MLH1-Wildtyp keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Sowohl der Wildtyp als auch die I219V-Variante konnten etwa 40% der fehlerhaften Plasmide reparieren. In unserer Arbeit lag die DNA-Reparaturaktivität von MLH1-Wildtyp und MLH1-I219V Alteration um 50%. Der geringe Unterschied zwischen der Reparaturaktivität des Wildtyp (48,4%) und der MLH1-I219V (49,9%) ist statistisch nicht signifikant. Die etwa 10% höhere Reparaturaktivität unserer Experimente im Vergleich zu denen der finnischen Forscher, könnte an der Verwendung aktiverer Extrakte oder geeigneterer Substrate liegen.

Sehr interessant ist auch das Ergebnis einer aktuell erschienenen japanischen Studie (Takahashi *et al.*, 2007). Die japanische Forschergruppe untersuchte in ihrer Arbeit 101 verschiedene MLH1-Polymorphismen mit nur einem Nukleotidaustausch auf eine eventuell verminderte Mismatch-Reparaturfunktion und bewertete, inwieweit diese Alterationen mit dem Auftreten des Lynch-Syndroms zusammenhängen. Die Ermittlung der jeweiligen Reparaturaktivitäten der MLH1-Varianten erfolgte wie in unserer Arbeit und der Studie von Raevaara *et al.*, anhand eines *in vitro* DNA-Mismatch-Reparatur-Assay. In diesem Assay wurden Zellextrakte aus humanen Kolonkarzinomzellen (HCT116) mit den verschiedenen MLH1-Alterationen transfiziert und anschließend mit G-T fehlgepaarter DNA inkubiert. Dieser MMR-Assay ist dem unseren vom Ablauf sehr ähnlich, allerdings verwendeten wir statt der HCT116-Zellen HEK293T-Zellen, die aus embryonalen Nierenzellen und nicht aus einer Darmkrebs-Zelllinie stammen. Die jeweiligen Reparaturaktivitäten der verschiedenen MLH1-Polymorphismen wurden anschließend quantitativ ausgewertet. Wie in unserer Arbeit wurden pro Alteration mehrere Assays durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben. In Takahashis Assay zeigten HCT116-Zellen, die mit dem MLH1-Wildtyp transfiziert wurden, eine durchschnittliche Reparaturaktivität von 79,7. Da MLH1-I219V nicht zur klinischen Ausprägung eines Lynch-Syndroms führt (Trojan *et al.*, 2002) wurde die Reparaturaktivität von I219V (um 60%) von Takahashi *et al.* als unterer Grenzwert für eine intakte Mismatch-Reparatur festgelegt. Im Gegensatz zu unserer Arbeit, bei der die Reparaturaktivität der MLH1-I219V Alteration sich nicht signifikant von der Reparaturfähigkeit des Wildtyps unterschied (48,4% vs. 49,9%), war die Reparaturfähigkeit der I219V-Variante bei Takahashi *et al.* somit wesentlich geringer als die des Wildtyps (60,7% vs. 79,7%). Diese verminderte Reparaturaktivität konnten die Japaner sich allerdings aufgrund der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht erklären. MLH1-I219V ist mit

einer Häufigkeit von bis zu 36% ein sehr häufig vorkommender Polymorphismus (Liu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997). Eine pathologisch verminderte Reparaturaktivität müsste demnach bei ca. einem Drittel der Personen vorhanden sein, was wiederum sehr unwahrscheinlich ist. Die von Takahashi *et al.* gefundene, erheblich verringerte Reparaturfähigkeit von MLH1-I219V könnte daraus resultieren, dass das Ergebnis der Japaner auf weniger Assays (z.B. nur 2 statt 3 Assays) basiert. Desweiteren war der angewandte *in vitro* DNA-Mismatch-Reparatur-Assay unserem zwar ähnlich, jedoch nicht exakt gleich, so dass sich der Unterschied eventuell auch daraus begründen ließe. Die Tatsache, dass die Ergebnisse von drei unabhängig voneinander durchgeführten Assays, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Takahashi *et al.*, nicht wesentlich voneinander abweichen, verleiht unseren Resultaten eine hohe Aussagekraft. Während die Standardabweichung des Wildtyp in unserer Studie lediglich bei 2,1% und die des Polymorphismus bei 3,5% lag, lagen die Standardabweichungen von Wildtyp und MLH1-I219V Alteration in der japanischen Studie bei 7,8% bzw. 11,7% und waren damit wesentlich höher als unsere. Ein weiteres Argument, das uns in der Annahme unterstützt, dass I219V die Reparaturfähigkeit des MLH1-Proteins nicht beeinträchtigt, ist die Tatsache, dass unsere Untersuchungen auf allen Ebenen (klinische, bioinformatische und biochemische Ergebnisse) keinerlei Hinweise auf eine verminderte MLH1-Funktion erkennen ließen.

#### **5.2.4 Fazit**

Nach den vorliegenden Ergebnissen lässt sich weder auf bioinformatischer noch auf biochemischer Ebene eine Funktionsänderung des MLH1-Proteins in Folge der I219V-Alteration vermuten, so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass der untersuchte Polymorphismus direkt zur Entstehung einer Colitis ulcerosa beiträgt oder ihren Verlauf beeinflusst. Unsere Daten weisen darauf hin, dass, ein mutmaßliches Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium) von MLH1-I219V bei der refraktären Colitis ulcerosa sehr viel schwächer ausgeprägt ist als ursprünglich vermutet oder auf bestimmte geographische Regionen begrenzt sein könnte.

Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass der IBD9-Locus nicht im *MLH1*-Gen, sondern in einem anderen Gen auf Chromosom 3 lokalisiert ist.

Die in der Kolonmukosa von Colitis ulcerosa häufig gefundene Mikrosatelliteninstabilität, die als charakteristisches Merkmal von Replikationsfehler im Rahmen einer nicht intakten Mismatch-Reparatur vorkommt, könnte anderen, vielleicht somatischen Ursprungs sein.

Denkbar wären z.B. eine Methylierung der *MLH1*-Promotorregion (Fleisher *et al.*, 2000) oder eine insuffiziente Mismatch-Reparatur infolge einer stark oxidativen Umgebung (Chang *et al.*, 2002; Gasche *et al.*, 2001)

## 6. Literaturverzeichnis

- Abdelrazeq AS, Wilson TR, Leitch DL, Lund JN, Leveson SH. 2005.** Ileitis in ulcerative colitis: is it a backwash? *Dis.Colon Rectum* **48**: 2038-2046.
- Adam B, Liebrechts T, Holtmann G. 2006.** [Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia Coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine]. *Z.Gastroenterol.* **44**: 267-269.
- Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. 2004.** Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* **126**: 1533-1549.
- Alani E. 1996.** The Saccharomyces cerevisiae Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mismatched DNA base pairs. *Mol.Cell Biol.* **16**: 5604-5615.
- Allen DJ, Makhov A, Grilley M, Taylor J, Thresher R, Modrich P, Griffith JD. 1997.** MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *EMBO J.* **16**: 4467-4476.
- Annese V, Piepoli A, Andriulli A, Latiano A, Napolitano G, Li HH, Forabosco P, Devoto M. 2002a.** Association of Crohn's disease and ulcerative colitis with haplotypes of the MLH1 gene in Italian inflammatory bowel disease patients. *J.Med.Genet.* **39**: 332-334.
- Annese V, Piepoli A, Andriulli A, Latiano A, Napolitano G, Li HH, Forabosco P, Devoto M. 2002b.** Association of Crohn's disease and ulcerative colitis with haplotypes of the MLH1 gene in Italian inflammatory bowel disease patients. *J.Med.Genet.* **39**: 332-334.
- Bagnoli S, Putignano AL, Melean G, Baglioni S, Sestini R, Milla M, d'Albasio G, Genuardi M, Pacini F, Trallori G, Papi L. 2004.** Susceptibility to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm.Bowel.Dis.* **10**: 705-708.
- Ban C, Junop M, Yang W. 1999.** Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell* **97**: 85-97.
- Ban C, Yang W. 1998.** Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95**: 541-552.
- Bernstein CN. 2001.** Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Curr.Gastroenterol.Rep.* **3**: 477-483.
- Biancone L, Mandal A, Yang H, Dasgupta T, Paoluzi AO, Marcheggiano A, Paoluzi P, Pallone F, Das KM. 1995.** Production of immunoglobulin G and G1 antibodies to cytoskeletal protein by lamina propria cells in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **109**: 3-12.
- Bitton A, Sewitch MJ, Peppercorn MA, deB E, Shah S, Ransil B, Locke SE. 2003.** Psychosocial determinants of relapse in ulcerative colitis: a longitudinal study. *Am.J.Gastroenterol.* **98**: 2203-2208.

- Blackwell LJ, Martik D, Bjornson KP, Bjornson ES, Modrich P. 1998.** Nucleotide-promoted release of hMutSalpha from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J.Biol.Chem.* **273**: 32055-32062.
- Bortlik M, Lukas M. 2001.** [Toxic megacolon]. *Cas.Lek.Cesk.* **140**: 619-623.
- Brentnall TA, Crispin DA, Bronner MP, Cherian SP, Hueffed M, Rabinovitch PS, Rubin CE, Haggitt RC, Boland CR. 1996.** Microsatellite instability in nonneoplastic mucosa from patients with chronic ulcerative colitis. *Cancer Res.* **56**: 1237-1240.
- Calkins BM. 1989.** A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig.Dis.Sci.* **34**: 1841-1854.
- Calkins BM, Lilienfeld AM, Garland CF, Mendeloff AI. 1984.** Trends in incidence rates of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dig.Dis.Sci.* **29**: 913-920.
- Cannavo E, Marra G, Sabates-Bellver J, Menigatti M, Lipkin SM, Fischer F, Cejka P, Jiricny J. 2005.** Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res.* **65**: 10759-10766.
- Chang CL, Marra G, Chauhan DP, Ha HT, Chang DK, Ricciardiello L, Randolph A, Carethers JM, Boland CR. 2002.** Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am.J.Physiol Cell Physiol* **283**: C148-C154.
- Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferrri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. 2005.** Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.* **11**: 7227-7236.
- Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Achkar JP, Cho JH, Hanauer SB, Brant SR, Bayless TM, Baldassano RN, Weeks DE. 2002.** Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. *Hum.Mol.Genet.* **11**: 2599-2606.
- Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. 2000.** High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am.J.Hum.Genet.* **66**: 1857-1862.
- Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F. 1991.** Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* **100**: 1590-1596.
- Dutta R, Inouye M. 2000.** GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends Biochem.Sci.* **25**: 24-28.
- Fernandez-Banares F, Hinojosa J, Sanchez-Lombrana JL, Navarro E, Martinez-Salmeron JF, Garcia-Puges A, Gonzalez-Huix F, Riera J, Gonzalez-Lara V, Dominguez-Abascal F, Gine JJ, Moles J, Gomollon F, Gassull MA. 1999.** Randomized clinical trial of *Plantago ovata* seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU). *Am.J.Gastroenterol.* **94**: 427-433.
- Fleisher AS, Esteller M, Harpaz N, Leytin A, Rashid A, Xu Y, Liang J, Stine OC, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Wilson KT, James SP, Herman JG, Meltzer SJ. 2000.**

Microsatellite instability in inflammatory bowel disease-associated neoplastic lesions is associated with hypermethylation and diminished expression of the DNA mismatch repair gene, hMLH1. *Cancer Res.* **60**: 4864-4868.

**Gasche C, Chang CL, Rhees J, Goel A, Boland CR. 2001.** Oxidative stress increases frameshift mutations in human colorectal cancer cells. *Cancer Res.* **61**: 7444-7448.

**Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. 2006.** New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* **367**: 1271-1284.

**Geng X, Biancone L, Dai HH, Lin JJ, Yoshizaki N, Dasgupta A, Pallone F, Das KM. 1998.** Tropomyosin isoforms in intestinal mucosa: production of autoantibodies to tropomyosin isoforms in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **114**: 912-922.

**Gionchetti P, Amadini C, Rizzello F, Venturi A, Poggioli G, Campieri M. 2003.** Probiotics for the treatment of postoperative complications following intestinal surgery. *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* **17**: 821-831.

**Godet PG, May GR, Sutherland LR. 1995.** Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* **37**: 668-673.

**Gradia S, Acharya S, Fishel R. 1997.** The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* **91**: 995-1005.

**Greenstein AJ, Aufses AH, Jr. 1985.** Differences in pathogenesis, incidence and outcome of perforation in inflammatory bowel disease. *Surg.Gynecol.Obstet.* **160**: 63-69.

**Gu L, Hong Y, McCulloch S, Watanabe H, Li GM. 1998.** ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res.* **26**: 1173-1178.

**Hagymasi K, Tulassay Z. 2006.** [Inflammatory bowel disease and colorectal cancer]. *Orv.Hetil.* **147**: 1977-1982.

**Halstensen TS, Das KM, Brandtzaeg P. 1993.** Epithelial deposits of immunoglobulin G1 and activated complement colocalise with the M(r) 40 kD putative autoantigen in ulcerative colitis. *Gut* **34**: 650-657.

**Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, Bridger S, MacPherson AJ, Stokkers P, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. 2001.** Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut* **48**: 191-197.

**Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. 1999.** Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am.J.Hum.Genet.* **65**: 1647-1655.

**Herfarth H. 2002.** [Laboratory values, endoscopy and new imaging. What is the status of diagnosis?]. *Internist (Berl)* **43**: 1354-1356.

**Herrlinger K, Stange EF. 2004.** [Chronic inflammatory bowel diseases]. *Dtsch.Med.Wochenschr.* **129**: 2241-2250.

- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. 2001.** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. 1996.** Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **379**: 821-823.
- Iaccarino I, Marra G, Palombo F, Jiricny J. 1998.** hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalpha. *EMBO J.* **17**: 2677-2686.
- Jiricny J, Marra G. 2003.** DNA repair defects in colon cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **13**: 61-69.
- Junop MS, Obmolova G, Rausch K, Hsieh P, Yang W. 2001.** Composite active site of an ABC ATPase: MutS uses ATP to verify mismatch recognition and authorize DNA repair. *Mol.Cell* **7**: 1-12.
- Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la CA, Peltomaki P. 2000.** Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am.J.Pathol.* **156**: 1773-1779.
- Kunkel TA, Erie DA. 2005.** DNA mismatch repair. *Annu.Rev.Biochem.* **74**: 681-710.
- Lakatos PL. 2006.** Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? *World J.Gastroenterol.* **12**: 6102-6108.
- Lichtiger S, Present DH, Kornbluth A, Gelernt I, Bauer J, Galler G, Michelassi F, Hanauer S. 1994.** Cyclosporine in severe ulcerative colitis refractory to steroid therapy. *N.Engl.J.Med.* **330**: 1841-1845.
- Littman SJ, Fang WH, Modrich P. 1999.** Repair of large insertion/deletion heterologies in human nuclear extracts is directed by a 5' single-strand break and is independent of the mismatch repair system. *J.Biol.Chem.* **274**: 7474-7481.
- Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Willson JK, Parsons RE, Jen J, Papadopolous N, Peltomaki P, de la CA, Hamilton SR, . 1995.** Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat.Genet.* **9**: 48-55.
- Loftus EV, Jr., Sandborn WJ. 2002.** Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.Clin.North Am.* **31**: 1-20.
- Lukas M, Bortlik M, Maratka Z. 2006.** What is the origin of ulcerative colitis? Still more questions than answers. *Postgrad.Med.J.* **82**: 620-625.
- Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang H. 1999.** A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* **5**: 271-278.

- Mawdsley JE, Rampton DS. 2005.** Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* **54**: 1481-1491.
- Mendoza JL, Lana R, Taxonera C, Alba C, Izquierdo S, Diaz-Rubio M. 2005.** [Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: differences between Crohn's disease and ulcerative colitis]. *Med.Clin.(Barc.)* **125**: 297-300.
- Mittermaier C, Dejaco C, Waldhoer T, Oefflerbauer-Ernst A, Miehsler W, Beier M, Tillinger W, Gangl A, Moser G. 2004.** Impact of depressive mood on relapse in patients with inflammatory bowel disease: a prospective 18-month follow-up study. *Psychosom.Med.* **66**: 79-84.
- Modrich P, Lahue R. 1996.** Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu.Rev.Biochem.* **65**: 101-133.
- Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE, Wakefield AJ. 1999.** Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **116**: 796-803.
- Mushegian AR, Bassett DE, Jr., Boguski MS, Bork P, Koonin EV. 1997.** Positionally cloned human disease genes: patterns of evolutionary conservation and functional motifs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 5831-5836.
- Nielsen OH, Munck LK. 2007.** Drug insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat.Clin.Pract.Gastroenterol.Hepatol.* **4**: 160-170.
- Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. 2000.** Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand.J.Gastroenterol.* **35**: 1075-1081.
- Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. 2000.** The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am.J.Hum.Genet.* **67**: 1605-1610.
- Peeters M, Joossens S, Vermeire S, Vlietinck R, Bossuyt X, Rutgeerts P. 2001.** Diagnostic value of anti-Saccharomyces cerevisiae and antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease. *Am.J.Gastroenterol.* **96**: 730-734.
- Pohl C, Hombach A, Kruis W. 2000.** Chronic inflammatory bowel disease and cancer. *Hepatogastroenterology* **47**: 57-70.
- Pokorny RM, Hofmeister A, Galandiuk S, Dietz AB, Cohen ND, Neiberger HL. 1997.** Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with the DNA repair gene MLH1. *Ann.Surg.* **225**: 718-723.
- Polito JM, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM. 1996.** Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* **111**: 580-586.
- Price AB. 1978.** Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease--'colitis indeterminate'. *J.Clin.Pathol.* **31**: 567-577.

**Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D. 1998.** Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* **42**: 788-791.

**Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lonnqvist KE, Holinski-Feder E, Sutter C, McKinnon W, Duraisamy S, Gerdes AM, Peltomaki P, Kohonen-Ccorish M, Mangold E, Macrae F, Greenblatt M, de la CA, Nystrom M. 2005.** Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology* **129**: 537-549.

**Ramilo C, Gu L, Guo S, Zhang X, Patrick SM, Turchi JJ, Li GM. 2002.** Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A. *Mol. Cell Biol.* **22**: 2037-2046.

**Raptis S, Mrkonjic M, Green RC, Pethe VV, Monga N, Chan YM, Daftary D, Dicks E, Younghusband BH, Parfrey PS, Gallinger SS, McLaughlin JR, Knight JA, Bapat B. 2007.** MLH1 -93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **99**: 463-474.

**Raschle M, Dufner P, Marra G, Jiricny J. 2002.** Mutations within the hMLH1 and hPMS2 subunits of the human MutLalpha mismatch repair factor affect its ATPase activity, but not its ability to interact with hMutSalpha. *J.Biol.Chem.* **277**: 21810-21820.

**Raschle M, Marra G, Nystrom-Lahti M, Schar P, Jiricny J. 1999.** Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J.Biol.Chem.* **274**: 32368-32375.

**Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. 1999.** Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* **354**: 635-639.

**Ricart E, Panaccione R, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. 2004.** Autoimmune disorders and extraintestinal manifestations in first-degree familial and sporadic inflammatory bowel disease: a case-control study. *Inflamm.Bowel.Dis.* **10**: 207-214.

**Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. 2000.** Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am.J.Hum.Genet.* **66**: 1863-1870.

**Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. 1989.** Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **97**: 900-904.

**Rothfuss KS, Stange EF, Herrlinger KR. 2006.** Extraintestinal manifestations and complications in inflammatory bowel diseases. *World J.Gastroenterol.* **12**: 4819-4831.

**Rudolph WG, Uthoff SM, McAuliffe TL, Goode ET, Petras RE, Galandiuk S. 2002.** Indeterminate colitis: the real story. *Dis.Colon Rectum* **45**: 1528-1534.

**Ruf G. 2006.** [Toxic megacolon--surgical point of view]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* **95**: 1727-1730.

- Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrugger RW. 1998.** Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur.J.Gastroenterol.Hepatol.* **10:** 243-249.
- Satsangi J, Grootsholten C, Holt H, Jewell DP. 1996a.** Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* **38:** 738-741.
- Satsangi J, Jewell DP, Rosenberg WM, Bell JI. 1994.** Genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* **35:** 696-700.
- Satsangi J, Parkes M, Jewell DP, Bell JI. 1998.** Genetics of inflammatory bowel disease. *Clin.Sci.(Lond)* **94:** 473-478.
- Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. 1996b.** Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat.Genet.* **14:** 199-202.
- Schmidt C, Stallmach A. 2005.** Etiology and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Minerva Gastroenterol.Dietol.* **51:** 127-145.
- Schmidt CM, Lazenby AJ, Hendrickson RJ, Sitzmann JV. 1998.** Preoperative terminal ileal and colonic resection histopathology predicts risk of pouchitis in patients after ileoanal pull-through procedure. *Ann.Surg.* **227:** 654-662.
- Sendid B, Colombel JF, Jacquinet PM, Faille C, Fruit J, Cortot A, Lucidarme D, Camus D, Poulain D. 1996.** Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **3:** 219-226.
- Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. 1996.** 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* **39:** 690-697.
- Silverberg MS. 2005b.** The time has come for NOD2/CARD15 testing for families with Crohn's disease: pro. *Inflamm.Bowel.Dis.* **11:** 504-506.
- Silverberg MS. 2005a.** The time has come for NOD2/CARD15 testing for families with Crohn's disease: pro. *Inflamm.Bowel.Dis.* **11:** 504-506.
- Stahlberg D, Gullberg K, Liljeqvist L, Hellers G, Lofberg R. 1996.** Pouchitis following pelvic pouch operation for ulcerative colitis. Incidence, cumulative risk, and risk factors. *Dis.Colon Rectum* **39:** 1012-1018.
- Sutherland L, Roth D, Beck P, May G, Makiyama K. 2000.** Oral 5-aminosalicylic acid for maintaining remission in ulcerative colitis. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* CD000544.
- Suzuki Y. 2005.** [Intestinal complications in ulcerative colitis]. *Nippon Rinsho* **63:** 867-873.
- Takahashi M, Shimodaira H, Andreutti-Zaugg C, Iggo R, Kolodner RD, Ishioka C. 2007.** Functional Analysis of Human MLH1 Variants Using Yeast and In vitro Mismatch Repair Assays. *Cancer Res.* **67:** 4595-4604.

- Taurog JD, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE. 1994.** The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J.Exp.Med.* **180:** 2359-2364.
- Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. 1996a.** Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* **312:** 95-96.
- Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. 1996b.** Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* **312:** 95-96.
- Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, Plotz G, Jiricny J, Marra G. 2002.** Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* **122:** 211-219.
- Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. 1988.** 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* **29:** 990-996.
- Warbrick E. 2000.** The puzzle of PCNA's many partners. *Bioessays* **22:** 997-1006.
- Wells AD, McMillan I, Price AB, Ritchie JK, Nicholls RJ. 1991.** Natural history of indeterminate colitis. *Br.J.Surg.* **78:** 179-181.
- Welsh KM, Lu AL, Clark S, Modrich P. 1987.** Isolation and characterization of the Escherichia coli mutH gene product. *J.Biol.Chem.* **262:** 15624-15629.
- Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J, Looman MW, Peltomaki P, Aaltonen LA, de la CA, Hofstra RM, Buys CH. 1997.** MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes.Cancer* **18:** 269-278.
- Xia B, Crusius J, Meuwissen S, Pe?a A. 1998.** Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World J.Gastroenterol.* **4:** 446-458.
- Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI. 1993.** Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* **34:** 517-524.

## 7. Publikationen/Danksagung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden zur Publikation angenommen bei der Zeitschrift *Inflammatory Bowel Disease*.

Die Recherchen, Überlegungen und Experimente für diese Arbeit wurden zwischen Juli 2005 und Februar 2007 im Forschungslabor der Gastroenterologie, Innere Medizin II, an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes gemacht. Herrn Prof. Dr. Stefan Zeuzem danke ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Klinik durchzuführen.

Ich danke meinen Betreuern Herrn Dr. Guido Plotz und Herrn Dr. Carsten Schmidt für ihr Engagement und ihre stete Hilfsbereitschaft während dieser Arbeit.

Herrn Mark Wormek möchte ich für seine Geduld und Hilfe bei meinen Experimenten danken.

Herrn PD. Dr. Dr. Albrecht Piiper, Herrn Jörg Haupenthal sowie allen anderen wissenschaftlichen Mitarbeitern des Gastro-Labors danke ich für das freundliche Arbeitsklima und die vielfältige Unterstützung, die ich erfahren habe.

Meinen Mitdoktoranden Michael Winkfein, Anna Nain, Markus Casper und David Reichard danke ich für die nette freundschaftliche Atmosphäre im Labor und die gemeinsamen Bowlingabende.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Peter, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

## 8. Lebenslauf

Name:	Anna Spina
Geburtsdatum	16.04.1983
Geburtsort	Saarbrücken
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch und italienisch
Schulische Ausbildung	September 1989 bis Juli 1993 Grundschule St.Arnual  August 1993 bis Juni 2002 Ludwigsgymnasium Saarbrücken Abschluss: Abitur
Studium:	seit Oktober 2002 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes 1.PJ-Tertial: Triemli Spital in Zürich 2. und 3. Tertial: Klinikum Saarbrücken
Promotion	Beginn Juli 2005 im Forschungslabor der Inneren Medizin II, Standort: Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Publikation	Angenommen zur Publikation bei der Zeitschrift <i>Inflammatory Bowel Disease</i>