

**Zentrum für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin**

Arbeitsgruppe für Pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. K. Ullrich

Thrombopoetin bei pädiatrischen Patienten  
mit chronisch entzündlichen  
Darmerkrankungen

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

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Fridrike Stute  
aus Hamburg

Hamburg

2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am 31.10.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Burdelski

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. G. Sauter

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. Kabisch / Prof. Dr. A. Lohse

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
2.1 CHRONISCH ENTZÜNDLICHE DARMERKRANKUNGEN .....	3
2.2 THROMBOPOETIN ALS MEDIATOR DER THROMBOPOESE .....	5
2.3 THROMBOPOETIN UND THROMBOZYTEN BEI CED .....	6
2.4 PROBLEMSTELLUNG.....	6
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
3.1 PATIENTENKOLLEKTIV UND UNTERSUCHUNGSMATERIAL.....	8
3.1.1 Berechnung des PCDAI nach Harms .....	9
3.1.2 Krankheitsaktivitätsgruppen des PCDAI.....	9
3.1.3 Berechnung des CUI nach Rachmilewitz.....	10
3.1.4 Krankheitsaktivitätsgruppen des CUI .....	10
3.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) .....	11
3.3 RNA-EXTRAKTION AUS DARMBIOPSATEN.....	12
3.4 RNA-GELELEKTROPHORESE .....	13
3.5 cDNA-SYNTHESE MITTELS REVERSER TRANSKRIPTION (RT) .....	13
3.6 DNA-AMPLIFIKATION MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION.....	14
3.7 KOMPETITIVE POLYMERASE-KETTENREAKTION .....	14
3.8 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	16
3.9 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE.....	17
3.10 SEQUENZANALYSE .....	17
3.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	17
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>18</b>
4.1 BEURTEILUNG DER KRANKHEITSAKTIVITÄT ANHAND VON LABORPARAMETERN UND AKTIVITÄTSINDIZES.....	18
4.2 TPO IM SERUM.....	19
4.2.1 Vergleich zwischen Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, nicht klassifizierbarer Kolitis und der Kontrollgruppe.....	19
4.2.2 Vergleich zwischen TPO und der Krankheitsaktivitätsstadien bei MC... 20	
4.2.3 Vergleich von TPO und PCDAI bzw. CUI .....	21
4.2.4 Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozyten .....	22
4.2.5 Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozyten aufgeteilt nach Krankheitsdiagnose.....	23
4.2.6 Korrelation zwischen PCDAI und TPO-Spiegel bei einzelnen Patienten.....	24
4.2.7 Korrelation zwischen Serum-TPO und verschiedenen APP.....	25
4.3 UNTERSUCHUNG DER DARMBIOPSATE .....	26
4.3.1 GAPDH .....	26
4.3.2 hTPO.....	28
4.4 QUANTIFIZIERUNG DER TPO-MRNA-EXPRESSION IM KOLON .....	28
4.4.1 hTPOfs .....	28
4.5 UNTERSUCHUNG VON LEUKOZYTEN AUF TPO .....	29
4.6 UNTERSUCHUNG DER KOLONBIOPSATE AUF DEN TPO-REZEPTOR cMPL .....	29
4.7 ANALYSE DER SPLEIßVARIANTEN MIT DEM PRIMER HTPOS .....	30

4.8 SEQUENZANALYSE DER KOLONBIOPSATE UND VERGLEICH MIT TPO-MRNA AUS DER LEBER DER RATTE .....	31
<b>5. DISKUSSION.....</b>	<b>33</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>40</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>41</b>
<b>8. LEBENSLAUF.....</b>	<b>45</b>
<b>9. PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>46</b>
9.1 ABSTRACTS .....	46
9.2 POSTER .....	46
<b>10. DANKSAGUNG.....</b>	<b>47</b>
<b>11. GERÄTE- UND REAGENZIENVERZEICHNIS.....</b>	<b>48</b>
11.1 GERÄTE .....	48
11.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....	48
11.3 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	49
<b>12. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>52</b>
12.1 ABBILDUNGEN.....	52
12.2 TABELLEN.....	52
<b>13. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>53</b>

# 1. Abkürzungen und Einheiten

% (v/v)	Volumenanteil
% (w/w)	Gewichtsanteil
Abb.	Abbildung
ag	Attogramm ( $10^{-18}$ Gramm)
amol	Attomol ( $10^{-18}$ Mol)
APP	Akutephaseprotein
AU	Arbitrary Units
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CHE	Cholinesterase
CU	Colitis ulcerosa
c-mpl	Gen für MPL
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
fg	Femtogramm ( $10^{-15}$ Gramm)
fmol	Femtomol ( $10^{-15}$ Mol)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GGT	Gammaglutamyltransferase
GTC	Guanidiniumthiocyanat
h	Stunden
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
kU	$10^3$ -fache Enzym-Aktivitätseinheit
MC	Morbus Crohn
min	Minuten

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MPL	TPO-Rezeptor
mRNA	Boten-RNA
NKC	Nicht klassifizierbare Kolitis
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
RT	reverse Transkription
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.	Sekunden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzym-Aktivitätseinheit
v-mpl	Onkogen des murinen Myeloproliferative-Leukämie-Virus

## 2. Einleitung

### 2.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Seit der Antike werden nicht-infektiöse Durchfallerkrankungen beschrieben [1-3]. Genauere Untersuchungen existieren jedoch erst ab der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts [4, 5]. Erste Beschreibungen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) bei Kindern gibt es von 1923 (Colitis ulcerosa) [6] und 1969 (Morbus Crohn) [7].

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen lassen sich differenzieren in M. Crohn (MC), Colitis ulcerosa (CU) und in eine nicht klassifizierbare Kolitis (NKC) [8-10]. Die kollagenöse Kolitis gehört zu den mikroskopischen Kolitiden. Morbus Crohn tritt mit zwei Erkrankungsgipfeln auf. Der erste mit den meisten Neuerkrankungen liegt zwischen dem 15. und 25., der zweite zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr. Ungefähr 25 % der Neuerkrankungen von Morbus Crohn treten schon in den ersten 20 Lebensjahren auf [11], bei der Colitis ulcerosa sind es sogar 15-40 %. Zu den Symptomen der CED im Kindesalter gehören Durchfälle, Bauchschmerzen, Erbrechen, rektaler Blut- und Schleimabgang, erhöhte Temperaturen oder Gewichtsverlust. In schweren Fällen kommt es zu Wachstumsretardierungen. Weiterhin finden sich extraintestinale Manifestationen wie Arthritiden, Iridozyklitiden oder ein Pyoderma gangränosum. Die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) ist gehäuft bei der Colitis ulcerosa anzutreffen. Bei pädiatrischen MC-Patienten ist in über 80 % der Fälle das terminale Ileum betroffen [12]. MC wird deshalb auch als Ileitis terminalis bezeichnet. Die entzündlichen Veränderungen können diskontinuierlich von oral bis anal auftreten. Rezidivierende Diarrhöen ohne Blut- oder Schleimabgang sprechen eher für einen MC. Die Diarrhöen sind häufig von Übelkeit und Erbrechen begleitet. Bauchschmerzen sind vornehmlich im rechten Unterbauch lokalisiert. Hier können auch vermehrt Resistenzen tastbar sein. Die CU beginnt immer rektal und schreitet kontinuierlich nach oral voran. Es ist mit Ausnahme der „Backwash-Ileitis“ nur das Kolon betroffen. Makroskopisch sind für den Morbus Crohn Aphthen, fissurale Ulzerationen, Pflastersteinrelief, Strikturen und Fisteln charakteristisch. Histologisch präsentiert sich der Morbus Crohn als eine unspezifische, segmentär angeordnete, granulomatöse Entzündung der gesamten Darmwand [13-15]. Im Gegensatz zu MC sprechen ein hochrotes Kolon mit einer

fehlenden Haustrierung, ein Befall ausschließlich der Mukosa, Kryptenabszesse und ein Becherzellverlust für eine CU.

Die nicht klassifizierbare Kolitis zeichnet sich durch Merkmale beider Erkrankungen aus [8-10]. Teilweise lässt sie sich im Verlauf der Erkrankung der einen oder anderen Diagnose zuordnen.

Die kollagenöse Kolitis ist eine seltene Erkrankung, die v. a. Frauen im mittleren Lebensalter betrifft. Sie ist durch verdickte subepitheliale Kollagenbänder charakterisiert [16].

Die Differentialdiagnose wird anhand klinischer Befunde, von Laborparametern und durch die Gastro- bzw. Koloskopie gestellt [17, 18]. Skip lesions bei MC können weiterhin durch Röntgenaufnahmen in „Seldinger-Technik“ nachgewiesen werden.

Die Ätiologie der CED ist letztendlich noch nicht geklärt. Es gibt jedoch verschiedene Theorien, die immunologische oder autoimmunologische Komponenten aber auch Schleimhautschädigungen durch Bakterien oder Viren als Ursache annehmen. Auch die Beteiligung einer psychogenen Komponente wird kontrovers diskutiert [19-25].

Die medikamentöse Therapie erfolgt durch Steroide, Immunsuppressiva, Immunmodulatoren und Antibiotika. In letzter Zeit gewinnt besonders bei sehr schweren Verlaufsformen die Behandlung mit einem TNF $\alpha$ -Rezeptorantagonisten an Bedeutung [26, 27].

Während bei schwersten Verlaufsformen der Colitis ulcerosa die Kolektomie eine kurative Therapieoption darstellt, wird die Indikation zu operativen Eingriffen beim Morbus Crohn nur äußerst zurückhaltend gestellt.

Bezüglich der Laborwerte ist die Thrombozytenzahl von Relevanz. Während die Thrombozytenzahl bei Gesunden zwischen 150 und 400 /nl liegt, zeichnet sich die CED, ganz besonders aber der MC, durch eine Erhöhung aus. Es ist bekannt, dass Patienten mit MC ein erhöhtes Risiko für Thrombembolien besitzen [28, 29]. Multifokale mikrovaskuläre Infarzierungen werden sogar als möglicher Pathomechanismus diskutiert [30-32].

## 2.2 Thrombopoetin als Mediator der Thrombopoese

Der wichtigste Faktor für die Bildung und Ausreifung der Blutplättchen ist Thrombopoetin (TPO). TPO ist ein Glykoprotein, dessen Gen auf dem langen Arm von Chromosom 3 lokalisiert ist. Das Gen besteht aus 6 Exons und 5 Introns und kodiert ein Protein von 353 Aminosäuren [33-35]. TPO ähnelt in seiner Struktur sehr dem Erythropoetin, unterscheidet sich jedoch am C-terminalen Ende. Hier befindet sich die thrombozytenspezifische Wirkung von TPO.

1961 wurde die Existenz eines Thrombozytose-induzierenden-Hormons im Plasma thrombozytopenischer Mäuse beschrieben [36]. Es wurde Thrombopoetin genannt, konnte jedoch über Jahre hinaus nicht isoliert werden. 1992 wurde das Gen für den TPO-Rezeptor c-Mpl kloniert [37] und dessen Expression auf CD34+-Zellen, Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen [38]. Das Gen für den c-Mpl-Liganden Thrombopoetin wurde dann 1994 fast gleichzeitig von fünf unterschiedlichen Gruppen kloniert [39-43]. Seitdem sind zahlreiche Studien zur Physiologie und Pathophysiologie von TPO durchgeführt worden.

In verschiedenen Studien wurde versucht, TPO therapeutisch einzusetzen. TPO erhöhte die Thrombozytenzahl in einigen, aber nicht in allen thrombozytopenischen Zuständen. Gerade im Rahmen myelosuppressiver Therapien war der klinische Nutzen eingeschränkt, da nach TPO-Applikation zwar die Thrombozytenzahl anstieg, die Schwere und die Länge der Thrombozytopenie jedoch nicht signifikant verändert wurden [44].

Bei Gesunden besteht eine reziproke Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und TPO-Konzentration im Blut [45]. Einige Autoren gingen bislang davon aus, dass stets eine konstante TPO-Menge von der Leber gebildet und sezerniert wird, welche dann von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten und Megakaryozyten gebunden wird. Nach Rezeptoraktivierung wird TPO internalisiert und abgebaut. Dies bedeutet, dass der TPO-Spiegel im Blut umso niedriger ist, je mehr Zellen, bzw. bindungsfähige Rezeptoren vorhanden sind, die zum Abbau beitragen [46], um die inverse Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und TPO-Konzentration zu gewährleisten.

In einer 1999 von Cerutti et al. veröffentlichten Arbeit wurden Entzündungsparameter bei Patienten nach Hüftgelenkersatz untersucht. Im postoperativen Verlauf fand sich eine reaktive Thrombozytose, der ein Anstieg der TPO-Konzentration

und verschiedener Akutephaseproteine (APP) vorausging [47]. APP sind vorwiegend in der Leber gebildete Plasmaproteine, deren Serumkonzentration bei akuten entzündlichen Prozessen ansteigt. Physiologisch wird ein Teil des Anstiegs durch IL-6 vermittelt. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass in-vitro die TPO-Produktion durch Gabe von Il-6 und anderen Faktoren stimuliert werden kann [48, 49]. Diese Daten legen nahe, TPO nicht nur als Regulator der Thrombopoese sondern darüber hinaus auch als APP zu sehen.

Die Ursache der erhöhten TPO-Konzentration bei Entzündungsreaktionen ist bislang ungeklärt. In der Leber als dem Hauptsyntheseort für TPO werden rund 95 % gebildet [50]. Weiterhin ist eine geringe TPO-Produktion auch in anderen Organen wie Niere oder Knochenmark beschrieben worden [50]. Nachweise, ob die gesteigerte TPO-Synthese bei Entzündungsreaktionen extrahepatischen Ursprungs sein könnte, fehlen bislang.

### 2.3 Thrombopoetin und Thrombozyten bei CED

Wie bereits erwähnt finden sich bei CED erhöhte Thrombozytenzahlen. Wolber und Heits beschreiben 1999 erhöhte TPO-Spiegel bei Patienten mit CED [51, 52]. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass die erhöhte Blutplättchenanzahl bei CED auf eine erhöhte TPO-Produktion der Leber, stimuliert durch bei MC ausgeschüttete Faktoren wie Il-6 oder im Sinne einer Akutephasereaktion zurückzuführen ist. Andererseits könnte TPO auch direkt im entzündlich veränderten Darm gebildet werden. Ein Hinweis darauf ist von einer japanischen Arbeitsgruppe gefunden worden, die eine TPO-Expression im Dickdarm von Ratten nachgewiesen hat [53]. Eine TPO-Expression im menschlichen Kolon ist allerdings noch nicht beschrieben worden.

### 2.4 Problemstellung

Die klinische Beobachtung zeigt bei Patienten mit CED erhöhte Thrombozytenwerte. Einige Autoren diskutieren multifokale mikrovaskuläre Infarzierungen bedingt durch Thrombembolien aufgrund der vorliegenden Thrombozytose sogar als mög-

lichen Pathomechanismus für CED [30-32, 52]. TPO ist der wichtigste Regulator der Thrombopoese.

Es ist daher von Interesse, wie sich der Serum-TPO-Spiegel und die Thrombozytenzahl der CED-Patienten in Bezug auf die Krankheitsaktivität verhält.

Um die angesprochene Hypothese zu unterstreichen, dass sich TPO im Sinne eines Akutephaseproteins verhält, wird in der vorliegenden Arbeit das Verhältnis von Serum-TPO zu bekannten Akutephaseproteinen untersucht.

Da der Expressionsort der gesteigerten TPO-mRNA-Expression bislang nicht geklärt ist, soll mit der vorliegenden Arbeit das Kolon als möglicher Expressionsort untersucht werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Patientenkollektiv und Untersuchungsmaterial

Es wurden insgesamt 179 Blutproben von 78 pädiatrischen Patienten (weiblich n=34, männlich n=44) untersucht. Von 25 dieser Patienten lagen 43 Kolonbiopsate vor. Das Patientenalter lag zum Zeitpunkt der Untersuchung zwischen 10 Monaten und 17 Jahren. Das Körpergewicht der Kinder lag zwischen 6,9 und 65,4 Kilogramm. Die Blutproben wurden von 1998 bis 2000 im Rahmen der gastroenterologischen Sprechstunde der Arbeitsgruppe für Pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf oder bei der stationären Aufnahme eines Patienten zur Koloskopie entnommen.

Bei mehrmaligen Vorstellungen einzelner Patienten wurde, damit die Ergebnisse durch die zumeist schwerer Erkrankten nicht verzerrt wurden, jeweils die erste Untersuchung in diesem Zeitraum für den Vergleich der Krankheiten herangezogen.

28 Patienten litten an Morbus Crohn, 16 an Colitis ulcerosa. In 17 Fällen lag eine unspezifischen Kolitis und einem Fall eine kollagenöse Kolitis vor. Als Kontrollgruppe dienten 13 Patienten, bei denen weder klinisch noch in der Koloskopie ein Anhalt für eine CED bestand. Zusätzlich untersucht wurden drei Patienten mit systemischen Erkrankungen.

Die Einwilligung der Eltern für die Untersuchung lag vor.

Die Einschätzung der CED-Aktivität erfolgte bei Colitis ulcerosa nach dem CUI (Colitis ulcerosa Activity Index) nach Rachmilewitz [54]. Bei Morbus Crohn wurde die Aktivität in Anlehnung an den PCDAI (Paediatric Crohn`s Disease Activity Index) nach Harms [55] beurteilt. Die Linksverschiebung der Leukozyten (gemessen am Anteil der stabkernigen Granulozyten an der Gesamtgranulozytenzahl) floss in die Berechnung nicht mit ein, da sie in vielen Fällen nicht bestimmt worden war. Sofern die Stabkernigen bestimmt wurden, betrug ihr Anteil lediglich 0-1 % der Leukozyten. Durch den niedrigen Multiplikationsfaktor, mit dem die Zahl der stabkernigen Granulozyten in die Berechnung des PCDAI eingeht, kam es zu keinem Unterschied in der Beurteilung der Krankheitsaktivität der MC-Patienten.

### 3.1.1 Berechnung des PCDAI nach Harms

**Tabelle 1:** Berechnung des PCDAI nach Harms [55]. Klinische und Laborparameter werden durch einen Faktor unterschiedlich gewichtet und dann addiert.

Berechnungsfaktor	Parameter
20,2	Appetit (1=gut, 2=mäßig, 3=schlecht)
2,4	Anzahl der Stühle pro Woche
0,8	BSG (mm/h)
-0,3	Serum-Eisenkonzentration ( $\mu\text{g/dl}$ )
4,1	$\alpha 2$ Globulin (% des Serum-Gesamtproteingehaltes)
1,3	Stabkernige Granulozyten (% der Leukozyten)

### 3.1.2 Krankheitsaktivitätsgruppen des PCDAI

**Tabelle 2:** Unterteilung der Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn in eine geringe, mäßige und hohe Aktivität nach dem PCDAI [55].

Krankheitsaktivität	PCDAI-Punkte
Gering	<150
Mäßig	150-220
Hoch	>220

Punktwerte unter 150 zeigen eine niedrige, Werte zwischen 150 und 220 eine mäßige und Werte über 220 eine hohe Krankheitsaktivität an.

### 3.1.3 Berechnung des CUI nach Rachmilewitz

**Tabelle 3:** Klinische Faktoren, extraintestinale Manifestationen und Laborparameter, die in den CUI mit eingehen [54].

Parameter	Bewertungskriterien	Bewertung
Stuhlfrequenz/Woche	<18	0
	18-35	1
	36-60	2
	>60	3
Meläna	keine	0
	wenig	2
	viel	4
Allgemeinzustand	gut	0
	durchschnittlich	1
	schlecht	2
	sehr schlecht	3
Abdominelle Schmerzen / Krämpfe	keine	0
	leicht	1
	mäßig	2
	stark	3
Körpertemperatur	37-38°C	0
	>38°C	3
Extraintestinale Symptome	Iritis	3
	Erythema nodosum	3
	Arthritis	3
Laborparameter	BSG >50/h	1
	BSG >100/h	2
	Hämoglobin <100g/l	4

### 3.1.4 Krankheitsaktivitätsgruppen des CUI

**Tabelle 4:** Unterteilung der Krankheitsaktivität von Colitis ulcerosa in Remission, leichten, mittelschweren und schweren Schub nach dem Punktwert des CUI.

Krankheitsaktivität	CUI-Score
Remission	<4
leichter Schub	4-7
mittelschwerer Schub	8-9
schwerer Schub	≥10

Ein Score von <4 Punkten bedeutet Remission, 4-7 leichter Schub, 8-9 mittelschwerer Schub und ≥10 schwerer Schub der Colitis ulcerosa.

Weiterhin wurden aus dem Routinelabor folgende Entzündungsparameter ausgewertet: CRP, BSG, Leukozyten, Thrombozyten, Albumin, CHE, GGT.

Für die TPO-Serum-Bestimmung wurde das in einem Serumröhrchen abgenommene Blut nach frühestens ½ Stunde und meistens innerhalb von 2 Stunden bei 17210 g pro Minute für 10 min. abzentrifugiert, der Überstand zu je ca. 500 µl in Eppendorfhütchen aliquotiert und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei –80 °C eingefroren.

Für die Untersuchung der TPO-mRNA-Expression im Kolon wurden Biopsate mit dem Koloskopiegerät PCF 130 (Olympus, Deutschland) gewonnen. Dabei wurden 1-3 Biopsate, sowohl aus makroskopisch entzündeten Arealen wie aus nicht entzündeten Bereichen entnommen. Die Proben wurden sofort nach Entnahme im OP in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei –80°C gelagert.

### 3.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Messung des Serum-TPOs wurde im CLB, Central Laboratory for Experimental and Clinical Immunology, Amsterdam durchgeführt.

Der ELISA für TPO basiert auf einem monoklonalen Antikörper (MoAb) [56]. Das Erkennungslimit liegt bei  $2 \pm 0,8$  AU/ml (Mittelwert  $\pm$  SD). Eine Kreuzreaktivität mit anderen Zytokinen wurde bisher nicht beobachtet. Der Assay hat eine Intra- und Interassay-Varianz von 5-7 % bzw. 7-13 %.

Eine 96-Lochplatte wurde mit einer Kombination aus aTPO5 und aTPO14 über Nacht bei Raumtemperatur beschichtet. Sowohl aTPO5 als auch aTPO14 lagen in einer Konzentration von 2 µg/ml in 100 µl 0,1 M Karbonat-Puffer (pH 9,6) vor.

Vor dem Assay wurden die Platten 2x mit 0,02% Tween in PBS (v/v) gewaschen. Nichtspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation bei Raumtemperatur mit 150 µl PBS, das 2 % (v/v) pasteurisierte Kuhmilch enthielt, für 30 min geblockt. Anschließend wurden die Platten mit 0.02% Tween in PBS 5x gewaschen.

50 µl biotinylierter MoAb (1 µg/ml) in High-Performance-ELISA-Puffer wurde mit 50 µl des Standards oder der Probe gemischt. Die Platte wurde für 2 Stunden unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platten wie oben beschrieben gewaschen und 100 µl Streptavidin polyHRP wurden in einer 1:10000-Verdünnung

in PBS / 2% Milch (v/v) hinzugefügt. Die Platten wurden erneut für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann gewaschen. Anschließend wurde das Substrat TMB (0,1 mg/ml), verdünnt in Substrat-Puffer (0,11 M NaAc pH 5,5 und 0,003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hinzugefügt.

Nach einer 30-minütigen Inkubation im Dunkeln wurde die kolorimetrische Reaktion durch Hinzufügen von 100 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die Absorption bei 450 nm in einem Titertek Multiscan Elisa-Reader gemessen.

Von jeder Platte wurde zusammen mit mindestens zwei Referenzproben eine Standardkurve erstellt. Da rhTPO instabil zu sein scheint, d.h. der Betrag des rhTPO fällt mit der Zeit, wurde ein Pool von EDTA-antikoaguliertem Plasma von 6 Patienten mit hohem TPO-Spiegel als Standard eingesetzt. Die Standardkurve bestand aus 8 zweifachen Verdünnungen, von welchen die erste Verdünnung willkürlich auf 100 Arbitrary Units (AU) festgesetzt wurde. 1 AU entspricht 1 pg frischem rhTPO von Genentech Inc. und 9 pg, wenn es mit rhTPO von Research Diagnostics Inc. verglichen wird. Alle Proben wurden dreimal gemessen. Wenn ihre Konzentration den linearen Bereich der Kalibrationskurve überschritt, wurden die Proben in HPE verdünnt.

### 3.3 RNA-Extraktion aus Darmbiopsaten

Darmbiopsate wurden unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in 700 µl GTC/β-MESH durch Mörsern lysiert. Anschließend wurde eine saure Phenol-Chloroform-Extraktion zur Isolierung der Gesamt-RNA durchgeführt [57], die darauf beruht, dass sich RNA im Gegensatz zu DNA und Proteinen in der wässrigen Phase anlagert. Zu dem Homogenat wurden 70 µl NaOAc (pH 4,0), 560 µl Phenol (pH<4,5); 280 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol gegeben, für 15 min auf Eis inkubiert und für 20 min mit 17210 g bei 4 °C zentrifugiert. Zur Fällung der RNA wurden 500 µl der wässrigen obersten Phase mit 500 µl 2-Propanol versetzt. In 1h bei –80 °C oder über Nacht bei –20°C präzipitierte die RNA und wurde unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das getrocknete Pellet in 300 µl GTC/β-MESH resuspendiert und mit 300 µl 2-Propanol ein zweites Mal gefällt. Das neue Pellet wurde in 500 µL 75 %-igem Ethanol gewa-

schen und die RNA schließlich in 15 µL sterilem DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA-Lösungen wurden bis zur Weiterverarbeitung bei –80 °C gelagert.

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. 1 OD entspricht dabei 40 µg/mL RNA, d.h.:

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40.$$

Die Ratio  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  gilt als Maß für Verunreinigungen der RNA durch Proteine oder Phenol und soll >1,8 betragen [57].

### 3.4 RNA-Gelelektrophorese

1 µg RNA in 5 µl RNA-Ladepuffer wurde durch 15 min Erwärmen bei 68 °C denaturiert. Es wurde eine denaturierende Agarose-Gelelektrophorese (1,1 % Agarose, 2 % Formaldehyd in 1x Mops) bei 70 V für 1 h durchgeführt [57]. Die Laufstrecke des Bromphenolblaus betrug ca. 5 cm. Anschließend erfolgte eine fotografische Dokumentation unter UV-Beleuchtung. Anhand der Bandenverteilung der rRNA konnten RNA-Degradationen festgestellt werden.

### 3.5 cDNA-Synthese mittels reverser Transkription (RT)

1 µg RNA und 2,5 µl oligo-dT<sub>15</sub> wurden in 14,5 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei 68 °C denaturiert, anschließend mit den restlichen Reagenzien versetzt, so dass bei einem Gesamtvolumen von 25 µl folgende Konzentrationen resultieren: 1 µg/25 µl RNA, 0,5 µg/25 µl oligo-dT<sub>15</sub> (MWG, Biotech), je 500 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (TaKaRa), 100 U/25 µl M-MLV (Promega) Rtase, 50 mM Tris HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Dithiothreitol.

Die Proben wurden jeweils für 45 min bei 42°C und anschließend bei 52°C inkubiert. Anschließend wurde die Rtase durch 10-minütiges Erhitzen auf 100°C inaktiviert. Die erhaltene cDNA wurde bei 4°C oder –20° C gelagert.

Zunächst wurden als Positivkontrollen Proben mitgeführt, bei denen eine RNA-Expression bekannt war (unbehandelte HepG2-Zellen). Als Negativkontrolle für DNA- oder RNA-Verunreinigungen wurde jeweils in einem Ansatz ddH<sub>2</sub>O anstelle von RNA eingesetzt.

### 3.6 DNA-Amplifikation mittels Polymerasenkettenreaktion

Zur Untersuchung der Expression von TPO und GAPDH wurden von den beiden Primern flankierte DNA-Fragmente enzymatisch amplifiziert. In einem Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl waren für jede Probe 1 µl cDNA, 20 mM Tris HCl (pH 8,4), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 200 nM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,75 U Taq-Polymerase, je 400 nM Primer enthalten. Dem Ansatz wurden 3 Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz zugesetzt. In der Amplifizierung im Thermo-Cycler setzte sich ein Zyklus nach einer vorläufigen Denaturierung für 3 min bei 94°C jeweils aus der DNA-Denaturierungszeit mit 30 s bei 94°C, der Primer-Anlagerungszeit mit 45 s bei der jeweils ermittelten Annealing-Temperatur (GAPDH = 55°C, TPOs = 59°C, TPOfs = 62°C) und der Elongationszeit mit 60 s bei 72°C zusammen. Die Zyklen wurden 27x (GAPDH), bzw. 40x (TPOs und TPOfs) wiederholt. Anschließend folgte eine letzte Elongationsphase mit 540 s bei 72°C.

### 3.7 Kompetitive Polymerase-Kettenreaktion

Zur Quantifizierung der GAPDH-mRNA wurde eine kompetitive PCR durchgeführt. Ein als interner Standard verwendetes PCR-Produkt konkurriert mit der GAPDH-cDNA um die Bindung der Oligonukleotide. Dieses PCR-Produkt, der so genannte Kompetitor weist durch eine Deletion von 86 bp eine andere Laufweite in der Gelelektrophorese auf und kann somit vom cDNA-PCR-Produkt unterschieden werden. Die Kompetitor-Stammlösung wurde aliquotiert, und nach Bedarf wurden 1:2-Verdünnungsreihen hergestellt.

Die kompetitive PCR wurde wie die im vorherigen Abschnitt beschriebene DNA-Amplifikation durchgeführt. In jedem Ansatz war zusätzlich als interner Standard 1 µl einer Kompetitorlösung mit bekannter Konzentration enthalten. Für jede cDNA-Probe wurden 4 PCR-Reaktionen mit aufeinander folgenden Konzentrationen der 1:2-Verdünnungsreihe des Kompetitors angesetzt. Sowohl von der cDNA-Probe wie auch vom Kompetitor wurden 10 µl einer 1:10-Verdünnung eingesetzt, um Pipettierfehler zu verringern.

Die Konzentration der cDNA wurde anhand der Äquivalenzkonzentration zwischen cDNA und Kompetitor ermittelt. Bei dieser Kompetitor-Konzentration weisen beide Proben gleichstark fluoreszierende Banden auf.

Aus der Äquivalenzkonzentration wurde die TPO-mRNA-Konzentration pro Mikrogramm Gesamt-RNA errechnet. Dabei wurden die molekulare Masse des Kompetitors, die in der RT eingesetzte Menge Gesamt-RNA, die RT-Effizienz und die Tatsache, dass der Kompetitor doppelsträngig ist, wohingegen die cDNA einzelsträngig vorliegt, in folgender Formel berücksichtigt:

<b><math>C_{\text{TPO-mRNA}} = 2000 \cdot q / (M_{\text{Komp}} \cdot c_{\text{RNA}} \cdot f_{\text{RT}})</math></b>		
$C_{\text{TPO-mRNA}}$	TPO-mRNA-Konzentration	[amol/µg Gesamt-RNA]
Q	Äquivalenzkonzentration	[fg Kompetitor/50 µl PCR-Ansatz]
$M_{\text{Komp}}$	molekulare Masse des Kompetitors	[g/mol]
$c_{\text{RNA}}$	Gesamt-RNA-Konzentration	[µg/µl RT-Ansatz]
f	RT-Effizienz	

**Tabelle 5:** Verwendete Primer. 5'-GAPDH und 3'-GAPDH dienen zur Amplifizierung von GAPDH-cDNA (PCR-Produkt 256 bp), und 5'-hTPO und 3'-hTPO von TPO-cDNA (404 bp). Mit Hilfe von 5'-hTPO-K und 3'-hTPO wurde der interne Standard für die kompetitive PCR (318 bp) hergestellt. In der Sequenz von 5'-hTPO-K stellt = die Position der 86-bp-Deletion im Vergleich zur TPO-cDNA-Sequenz dar. Die angegebenen Positionen bezeichnen das erste und das letzte Nukleotid, an das das Oligonukleotid bindet [58, 59].

Primer	Position	Sequenz
<u>TPO</u>		
5'hTPO	6467-6486	5'-CGT TTC CTG ATG CTT GTA GG-3'
5'hTPO-comp	6467-6486, 6573-6592	5'-CGT TTC CTG ATG CTT GTA GG = CAA ACA GGA CTT CTG GAT TG-3'
5'hTPOs		5'-AGC TTT CTG GAC AGG TCC GT-3'
3'hTPO	6851-6870	5'-GAA GGA GAA TAT CCA GGC TG-3'
5'hTPO-fs	57-76	5'-CCC TTC TCC ACC CG.G ATA GA-3'
5'hTPO-fs-comp	122-141	5'-AGT GCA AGA GCC TAA GCC GC-3'
3'hTPO-fs	584-565	5'-CCC AAG GAG GAG ACG GAC CT-3'
<u>GAPDH</u>		
5'-GAPDH	4296-4315	5'-ATC ATC CCT GCC TCT ACT GG-3'
3'-GAPDH	4533-4552	5'-TGG GTG TCG CTG TTG AAG TC-3'

### 3.8 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der PCR wurden die Proben für ca. 1 h in einem mit Ethidiumbromid versetzten (3µl Ethidiumbromid auf 100 ml Agarose) 2%igen Agarose-Gel in einer Gelelektrophorese in 1xTBE-Puffer bei 100–120 V aufgetrennt. Die Länge der PCR-Produkte wurde durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard ermittelt. Es folgte eine fotografische Dokumentation unter UV-Beleuchtung.

### 3.9 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid- (PAA) Gele haben eine deutlich höhere Auflösungskapazität als Agarose-Gele und sind daher besser geeignet, Banden mit nur kleinen Längendifferenzen aufzutrennen. TPO-mRNA-Spleißvarianten haben z. T. nur eine Längendifferenz von 12 bp.

Nach der Amplifikation wurden die Banden der PCRs mit dem Primer hTPOs im PAA-Gel aufgetrennt. Das PAA-Gel bestand hierbei aus einem 4%-igen Sammelgel und einem 6%-igen Trenngel. Aliquots von 35 µl wurden mit 7 µl blue dye versetzt und geladen. Es wurde eine Gelelektrophorese zunächst für 1 h bei 80 V im Sammelgel, dann für 3 h bei 120 V und noch einmal 3 h bei 150 V im Trenngel durchgeführt. Als Ladepuffer wurde ein 1x EDTA-Laufpuffer verwendet. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Beleuchtung fotografiert.

### 3.10 Sequenzanalyse

Das mit dem Primer hTPOfs amplifizierte PCR-Produkt wurde nach Aufreinigung mit PCR-Preps (Wizard Purifikation Systems) sequenziert (GATC, Konstanz).

Sämtliche Arbeitsgänge beim Aliquotieren der Proben, beim ELISA, bei der RNA-Extraktion, der reversen Transkription, und der Polymerasenkettenreaktion wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.11 Statistische Auswertung

Die Daten sind als Range, Perzentile bzw. als Median (bei nicht normaler oder unbekannter Verteilung) angegeben. Zur Unterschiedsprüfung der Tendenz nicht normalverteilter Stichproben wurde das nichtparametrische Verfahren nach Wilcoxon eingesetzt. Als Signifikanzgrenze wurde der Wert  $P < 0,05$  festgelegt. Die statistische Auswertung sowie die Signifikanzprüfungen wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS durchgeführt

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Beurteilung der Krankheitsaktivität anhand von Laborparametern und Aktivitätsindizes

In dieser Studie wurden 78 Patienten untersucht (28 Patienten mit der Diagnose MC, 16 mit CU, ein Patient mit kollagenöser Kolitis, 17 mit NKC, 13 Kontrollpatienten ohne CED, 3 Patienten systemischen Erkrankungen). Das Patientenalter lag zwischen 0 und 17 Jahren. 32 Patienten waren weiblich und 46 männlichen Geschlechts. 77,6 % der Patienten lagen mit der Körpergröße unterhalb der 50. Perzentile. Bezogen auf das Körpergewicht waren es 68,3 %.

Der Schweregrad der CED wurde anhand des PCDAI bzw. des CUIAI bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Auswertung weitere Entzündungsparameter.

Der PCDAI konnte bei 27 von 28 Patienten berechnet werden. Die Indexwerte lagen zwischen 125,46 und 324,52. Dabei fanden sich 11 Patienten (40,7 %) in Remission bzw. im leichten Schub, 11 Patienten (40,7 %) im mittelschweren und 5 Patienten (18,5 %) im schweren Schub.

Der CUIAI konnte bei 15 von 16 Patienten berechnet werden. Hier lagen die Werte zwischen 0 und 7. 12 Patienten (80 %) befanden sich in der Remission und 3 Patienten (20 %) im leichten Schub. Mittelschwere oder schwere Erkrankungen lagen nach diesem Index nicht vor. Weder bei MC-Patienten (w: Median 157,37; m: 151,87) noch bei CU-Patienten (w, m: Median 0) war hinsichtlich der Schwere der Erkrankung ein eindeutiger Geschlechtsunterschied zu erkennen.

Es fanden sich Thrombozytenzahlen von 202 /nl bis 833 /nl (Normwert 150–400 /nl). 36,6 % der Patienten wiesen eine erhöhte Thrombozytenzahl auf. Nach Diagnose einzeln ausgewertet lagen die Thrombozytenzahlen bei MC-Patienten zwischen 216–761 /nl (Median 459,5), bei CU-Patienten zwischen 214–833 /nl (Median 361 /nl), bei Patienten mit nicht klassifizierbarer Kolitis zwischen 274–644 /nl (Median 352 /nl), sowie bei Patienten in der Kontrollgruppe zwischen 202–349 /nl (Median 273,5 /nl).

Die CRP-Werte lagen im Bereich von <5 mg/dl bis 107 mg/dl (Normwert <5 mg/dl). Erhöhte Werte wurden bei 37 % der Patienten gefunden.

Die Werte der BSG lagen im Bereich von 2 mm/h bis 74 mm/h (Normwert  $\leq 10$  mm/h). Wir fanden erhöhte Werte bei 59,3 % der Patienten. Der Median betrug bei

MC-Patienten 21 mm/h, bei CU-Patienten und bei Patienten mit nicht klassifizierbarer Kolitis 10 mm/h und in der Kontrollgruppe 15 mm/h.

Als weitere Parameter im Gesamtkollektiv fanden sich Leukozytenzahlen von 4,7–18,7 /nl, Albuminwerte von 27-51 g/l, eine CHE von 2,9-7,9 U/l und eine GGT von 1–145 U/l,

## 4.2 TPO im Serum

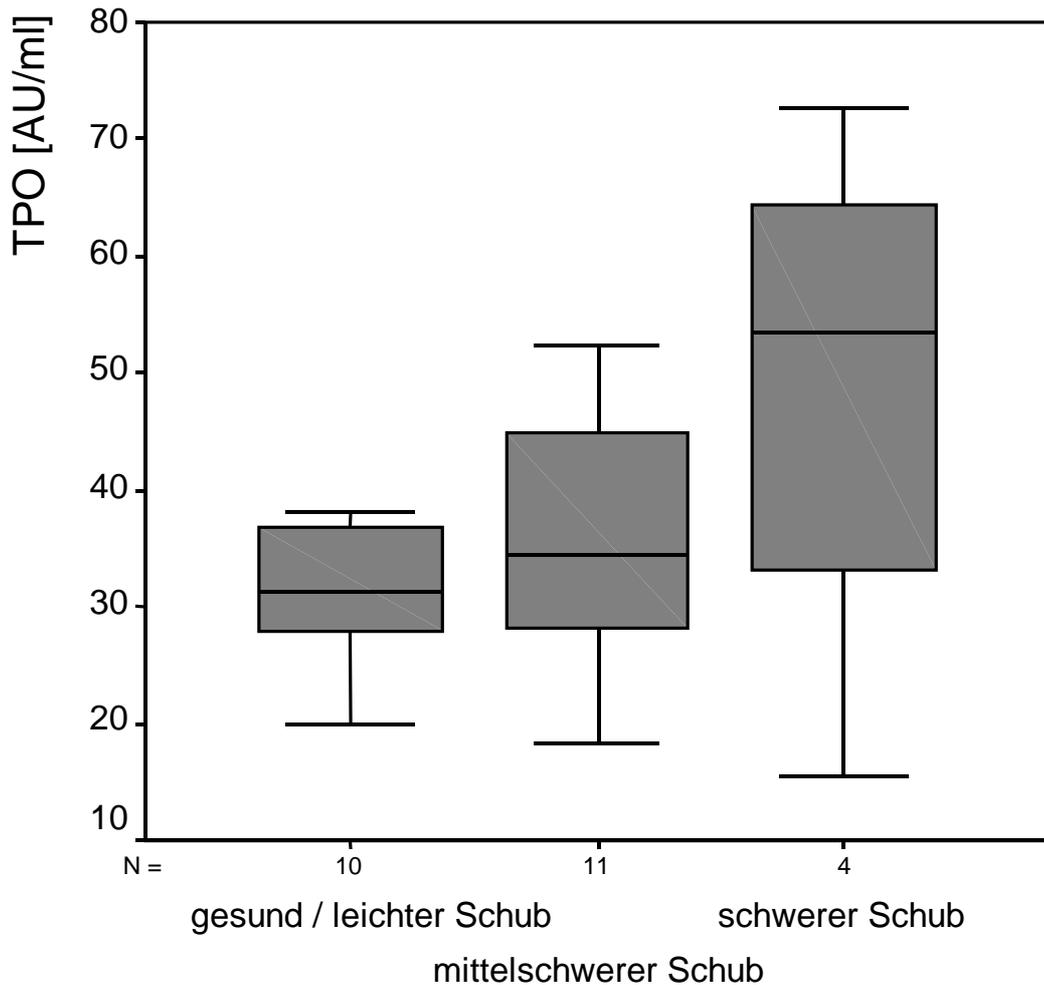
### **4.2.1 Vergleich zwischen Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, nicht klassifizierbarer Kolitis und der Kontrollgruppe**

Die TPO-Werte im Gesamtkollektiv lagen im Bereich von 2,8–72,8 AU/ml (Median 28,57 AU/ml). Bei MC-Patienten lag der TPO-Bereich zwischen 15,44–72,8 AU/ml (Median 34,34 AU/ml), bei CU-Patienten zwischen 15,89–56,94 AU/ml (Median 24,8 AU/ml), bei Patienten mit nicht klassifizierbarer Kolitis zwischen 2,8– 66,31 AU/ml (Median 25,94 AU/ml) und in der Kontrollgruppe zwischen 16,64–54,42 AU/ml (Median 28,04 AU/ml).

Sowohl der Maximalwert der TPO-Serumkonzentration als auch der Median lagen bei den Morbus-Crohn-Patienten höher als bei den anderen Erkrankungen oder in der Kontrollgruppe. Statistisch konnte die Erhöhung des Serum-TPO gegenüber anderen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach dem Wilcoxon-Test jedoch nicht signifikant belegt werden. Wir fanden weder einen geschlechts- noch einen altersspezifischen Unterschied der TPO-Konzentration.

#### 4.2.2 Vergleich zwischen TPO und der Krankheitsaktivitätsstadien bei MC

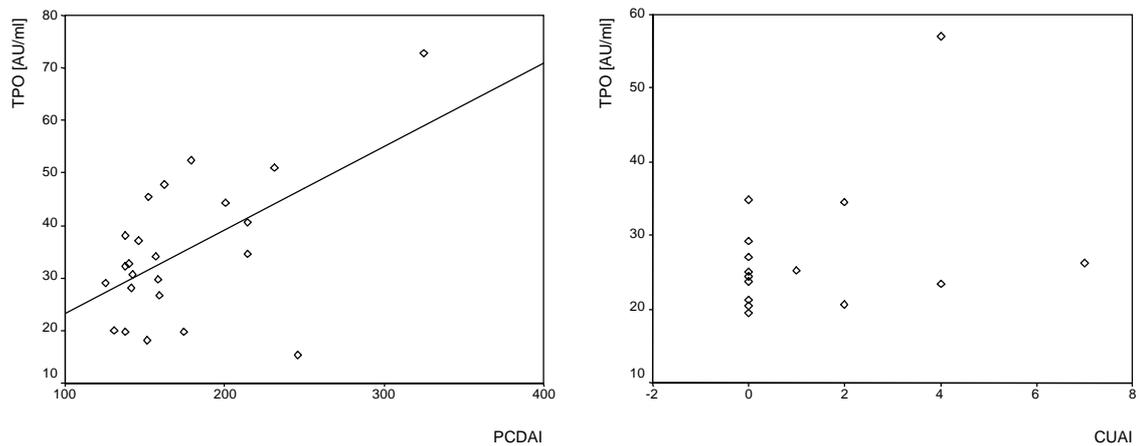
Bei der Untersuchung des TPO-Spiegels in Bezug auf die Krankheitsaktivität bei MC ließ sich ein Trend zu höheren TPO-Werten bei schwerer erkrankten Patienten erkennen. Ein statistisch signifikanter Unterschied war allerdings nicht nachweisbar.



**Abbildung 1:** TPO-Spiegel im Serum [AU/ml] bei verschiedenen Aktivitätsstufen des MC (Remission, mittelschwerer und schwerer Schub). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

### 4.2.3 Vergleich von TPO und PCDAI bzw. CUIAI

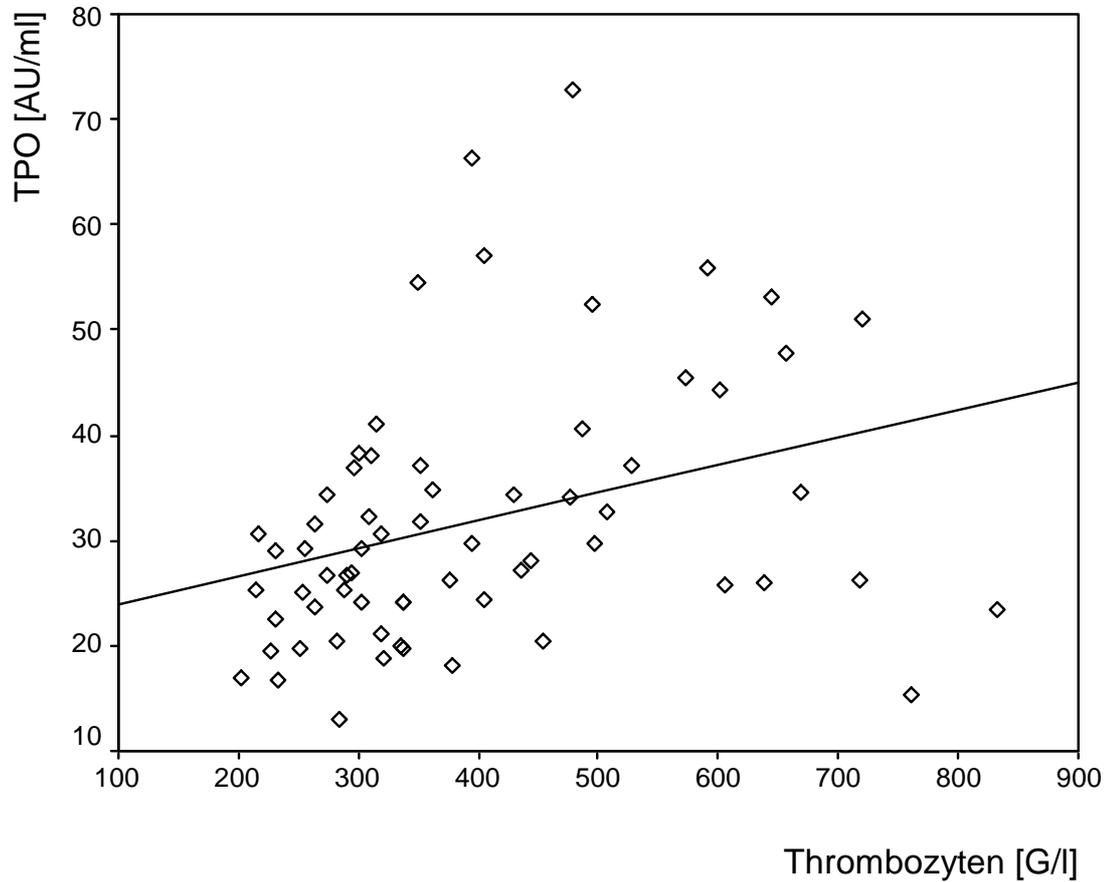
Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen Serum-TPO und PCDAI ( $k=0,56$ ;  $p<0,01$ ). Dagegen fand sich keine signifikante Korrelation zwischen TPO und CUIAI.



**Abbildung 2:** Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen Serum-TPO und dem PCDAI ( $k=0,56$ ;  $p<0,01$ ) (linke Graphik), hingegen besteht keine Korrelation zwischen Serum-TPO und dem CUIAI (rechte Graphik).

#### 4.2.4 Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozyten

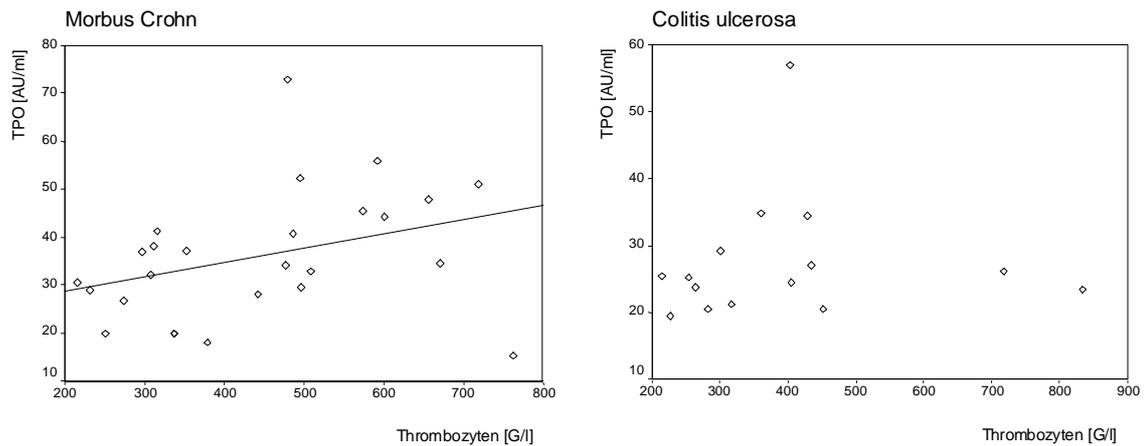
Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozytenzahl ( $k=0,325$ ;  $p<0,01$ ).



**Abbildung 3:** Signifikante Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozyten ( $k=0,325$ ;  $p<0,01$ ).

#### 4.2.5 Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozyten aufgeteilt nach Krankheitsdiagnose

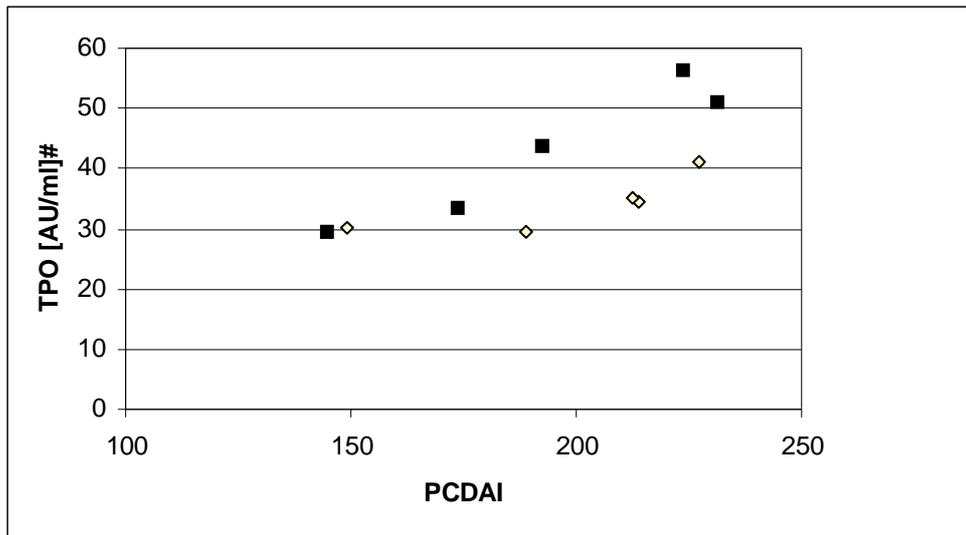
Bei Patienten mit Morbus Crohn fand sich eine signifikante Korrelation zwischen Serum-TPO und der Thrombozytenzahl ( $b=2,9 \text{ E-}2$ ;  $p<0,01$ ), während sich bei Colitis-ulcerosa-Patienten ein signifikanter Zusammenhang nicht nachweisen ließ ( $b=2,9 \text{ E-}3$ ,  $p>0,05$ ).



**Abbildung 4:** Regression von Serum-TPO und Thrombozyten aufgeteilt nach Morbus Crohn ( $b=2,9 \text{ E-}2$ ;  $p<0,01$ ) und Colitis ulcerosa ( $b=2,9 \text{ E-}3$ ;  $p>0,05$ ).

#### 4.2.6 Korrelation zwischen PCDAI und TPO-Spiegel bei einzelnen Patienten

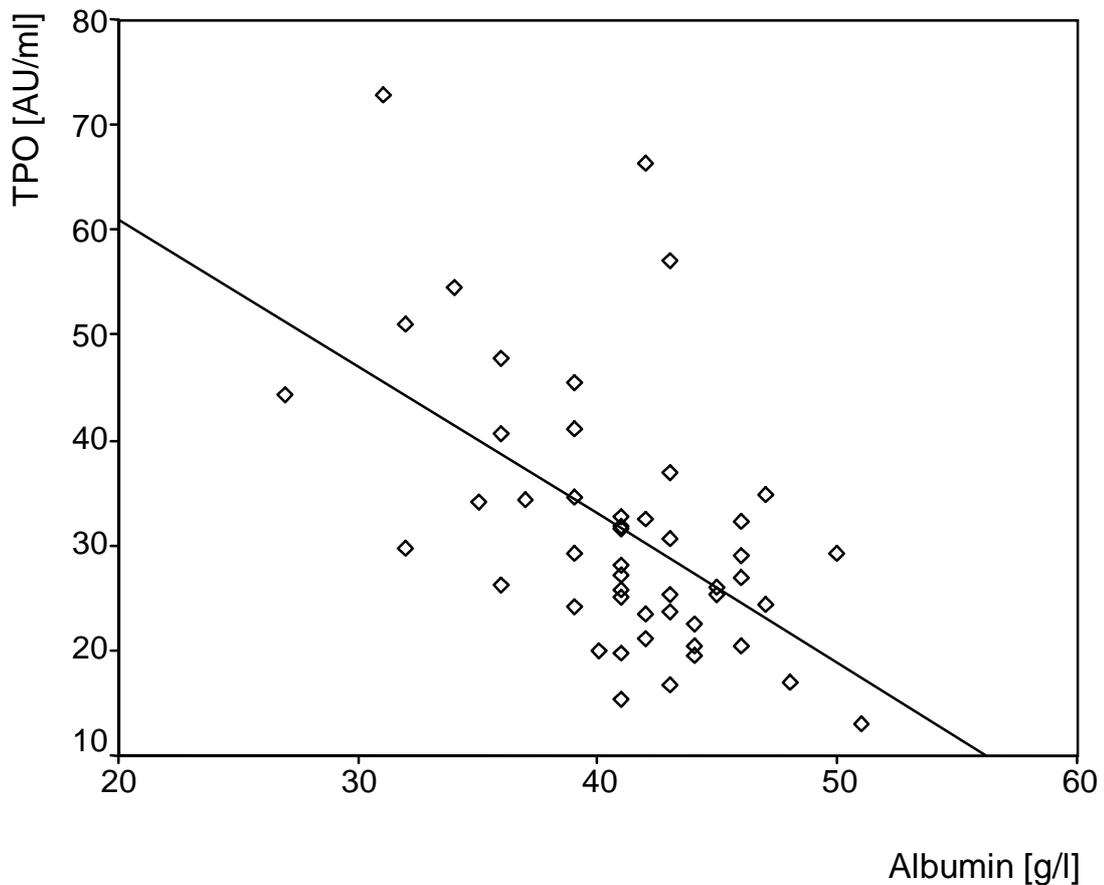
Zwei MC-Patienten mit einer schweren Verlaufsform wurden im Untersuchungszeitraum mehrfach vorstellig. Bei beiden Patienten ging die Zustandsverschlechterung mit jeweils höheren TPO-Spiegeln einher.



**Abbildung 5:** Korrelation zwischen TPO-Spiegel und PCDAI bei zwei MC-Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf.

#### 4.2.7 Korrelation zwischen Serum-TPO und verschiedenen APP

Weiterhin zeigten sich eine positive Korrelation zwischen TPO und CRP ( $k=0,317$ ;  $p<0,01$ ) und eine negative zwischen TPO und Albumin ( $k=-0,539$ ;  $p<0,01$ ), eine schwache Korrelation zwischen TPO und Leukozyten ( $k=0,277$ ;  $p<0,05$ ). Keine Korrelationen konnten wir zwischen TPO und dem Entzündungsparameter BSG und der CHE finden.

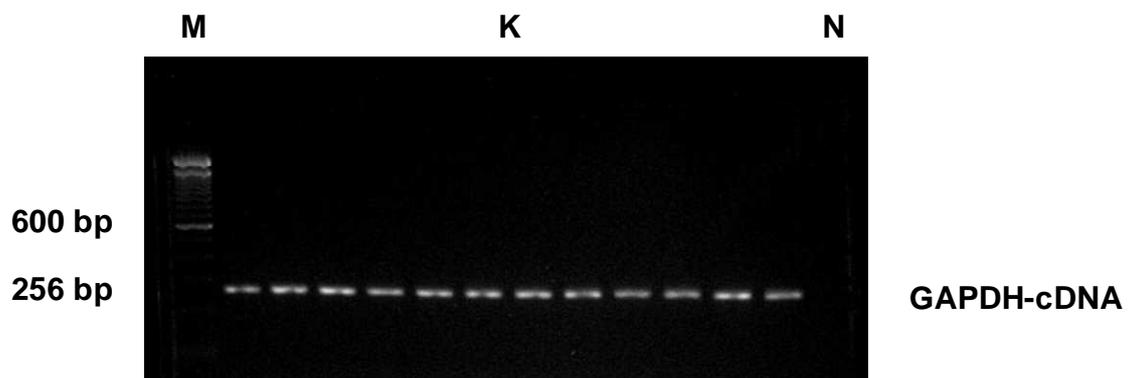


**Abbildung 6:** Gezeigt ist die negative Korrelation zwischen Serum-TPO und Albumin ( $k=-0,539$ ;  $p<0,01$ ). Albumin gehört zu den negativen APP. Diese sind durch einen Konzentrationsabfall bei steigender Entzündungsaktivität charakterisiert.

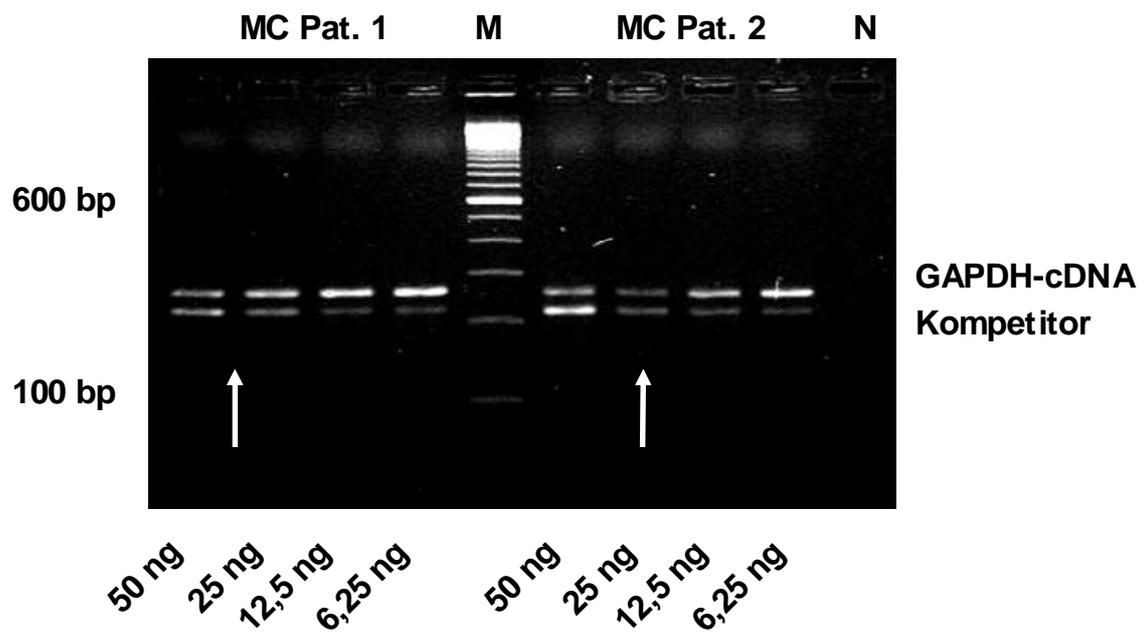
## 4.3 Untersuchung der Darmbiopsate

### 4.3.1 GAPDH

Um die Qualität der RNA aus den Darmbiopsien nachzuprüfen, wurden zunächst qualitative und semiquantitative PCRs mit GAPDH durchgeführt. In der qualitativen PCR konnte in 42 von 43 Proben, bzw. bei 22 von 23 Patienten GAPDH-cDNA nachgewiesen werden. Die Konzentration der mRNA bezogen auf die Gesamt-RNA betrug in der kompetitiven PCR maximal 140,93 amol/ $\mu$ l und minimal 0,29 amol/ $\mu$ l (Mittelwert 39,39 amol/ $\mu$ l, Standardabweichung 29,73 amol/ $\mu$ l, Median 52,85 amol/ $\mu$ l).



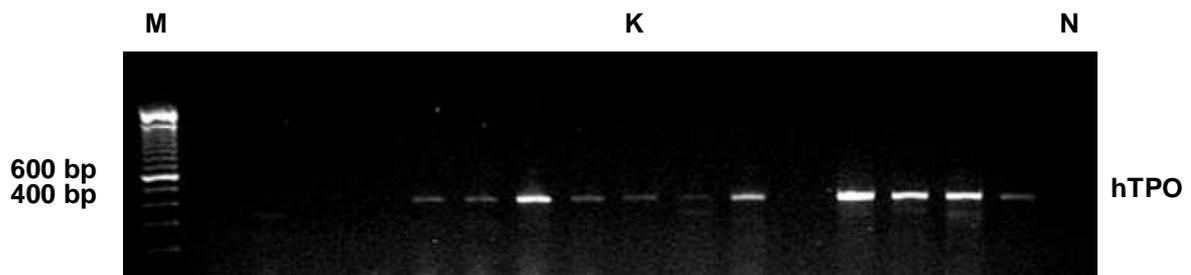
**Abbildung 7:** Qualitativer Nachweis der mRNA-Expression des house-keeping-Gens GAPDH im Kolongewebe. Bestätigung der mRNA-Expression der verwendeten Proben. *M* – Marker; *K* – Kolongewebe; *N* – Negativkontrolle.



**Abbildung 8:** Beispiel des Nachweises des GAPDH-mRNA-Gehaltes durch semiquantitative PCR. Bei Patient 1 (linke Bildhälfte) betrug der GAPDH-Gehalt zwischen 25-50 ng/ $\mu$ l Gesamt-RNA (siehe Pfeil). Bei Patient 2 (rechte Bildhälfte) lag der GAPDH-Gehalt bei etwa 25 ng/ $\mu$ l Gesamt-RNA (siehe Pfeil). *MC* – Morbus Crohn; *M* – Marker; *N* – Negativkontrolle.

### 4.3.2 hTPO

Mit dem Primer hTPO wurde überprüft, ob TPO-cDNA im Darmgewebe nachzuweisen war. In allen GAPDH-positiven Proben konnte hTPO nachgewiesen werden.

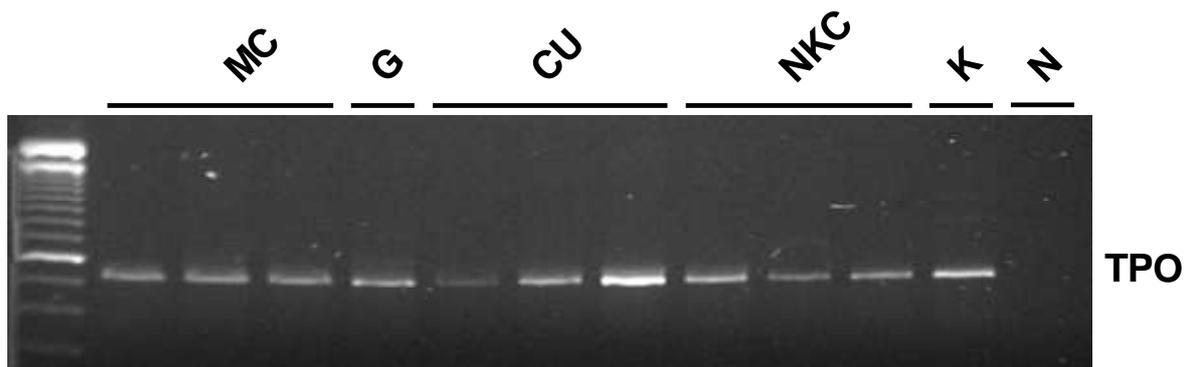


**Abbildung 9:** Qualitativer Nachweis von humanem TPO in der Kolonschleimhaut. Die Unterschiede in der Helligkeitsintensität weisen auf eine unterschiedlich starke mRNA-Expression hin. *M* – Marker; *K*- Kolongewebe; *N* – Negativkontrolle.

## 4.4 Quantifizierung der TPO-mRNA-Expression im Kolon

### 4.4.1 hTPOfs

Weiterhin wurde mit dem Primer hTPOfs Darm-TPO im Vergleich zu Leber-TPO bekannter Konzentration semiquantitativ ausgewertet. Um eine DNA-Kontamination auszuschließen, wurde ein exonübergreifenden Primer verwandt. In 13 der 16 ausgewerteten Proben konnte TPO-mRNA nachgewiesen werden. Es wurden lediglich Proben mit einer GAPDH-Konzentration von über 14,09 amol/ $\mu$ g RNA eingesetzt. Eine Leberprobe eines Patienten mit kompensierter Leberzirrhose besaß eine TPO-Konzentration von 33,8 amol TPO-mRNA/ $\mu$ g RNA und wurde in einer 100-fachen Verdünnung als Vergleich eingesetzt. Eine weitere Verdünnungsreihe mit dieser Leberprobe ergab, dass die TPO-Konzentration im Darm in den meisten Fällen zwischen 0,17 und 0,34 amol TPO-mRNA/ $\mu$ g RNA liegt. Das entspricht 0,5-1 % der Konzentration, die in der Vergleichsleberprobe gefunden wurde.



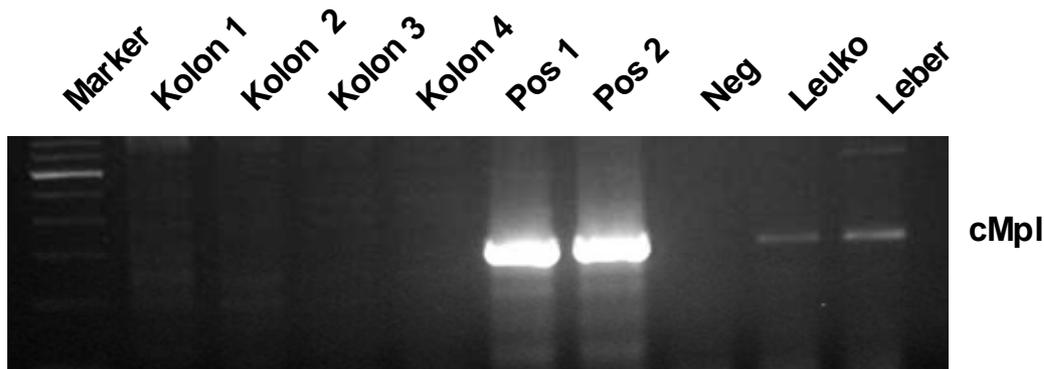
**Abbildung 10:** Qualitativer Nachweis von humanem TPO in der Darmmukosa mit dem Primer hTPOfs. Der exonübergreifende Primer schließt eine DNA-Kontamination aus. Für die weiteren Quantifizierungen wurde lediglich dieser Primer eingesetzt. *MC* – Morbus Crohn; *G* – gesunder Patient; *CU* – Colitis ulcerosa; *NKC* – nicht klassifizierbare Kolitis; *K* – Positivkontrolle; *N* – Negativkontrolle.

#### 4.5 Untersuchung von Leukozyten auf TPO

Bei Untersuchungen der Leukozyten aus 6 Pools ließ sich mit den Primern hTPOfs und hTPOs keine TPO-mRNA nachweisen. Dies wurde als nahezu sicherer Ausschluss einer TPO-mRNA-Expression in Leukozyten gewertet.

#### 4.6 Untersuchung der Kolonbiopsate auf den TPO-Rezeptor cMpl

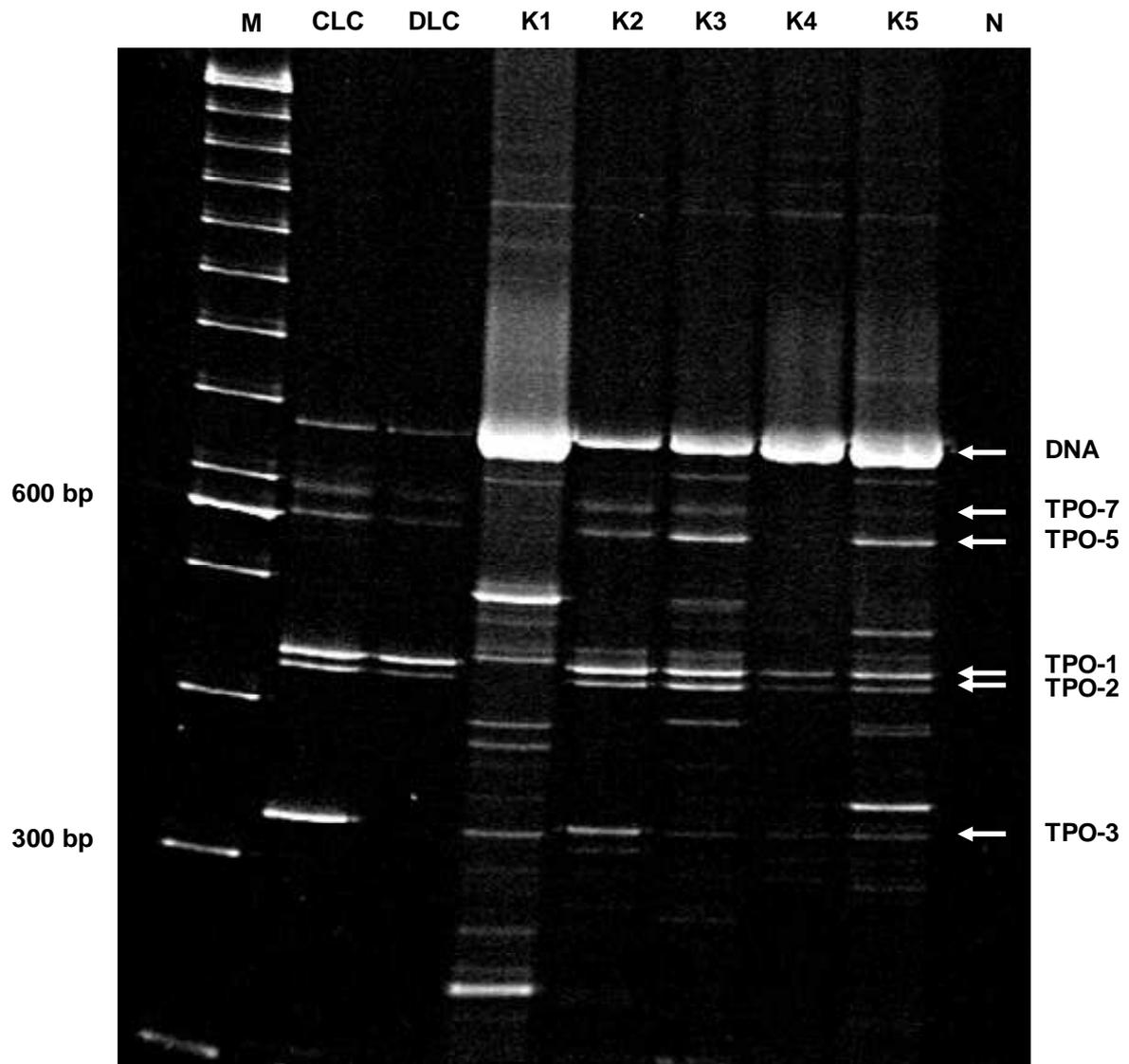
Darmproben wurden auf den TPO-Rezeptor cMpl untersucht. Es fand sich zwar sowohl in Leber wie auch Leukozyten eine cMpl-Expression, jedoch konnte sie nicht im Biopsatmaterial nachgewiesen werden.



**Abbildung 11:** Nachweis der Expression des TPO-Rezeptors cMpl in Leber und Leukozyten. Hingegen zeigen die Kolonbiopsate (*Kolon 1-4*) keine Expression des cMpl-Rezeptors. *Pos* – Positivkontrolle; *Neg* – Negativkontrolle; *Leuko* – Leukozyten.

#### 4.7 Analyse der Spleißvarianten mit dem Primer hTPOs

Nach der Auftrennung im Polyacrylamid-Gel wurden TPO-Spleißvarianten von Darm- und Lebergewebe analysiert. Sowohl in Darm- als auch Lebergewebe wurde eine Expression der verschiedenen TPO-Isoformen gefunden. Die beiden Leberproben zeigten eindeutige Banden, die den Spleißvarianten TPO-1, TPO-2 und TPO-3 [60] zugeordnet werden konnten. TPO-3 fand sich jedoch nur in einer der beiden Proben, hier jedoch besonders ausgeprägt. Zwei weitere Banden stimmten ihrer Größe nach mit TPO-5 und TPO-7 [61] überein. Wu beschrieb diese Isoformen allerdings nur bei der Maus [61]. In den Kolonbiopsaten fanden sich die Banden TPO-1 bis TPO-3. In drei der fünf Biopsaten ließ sich TPO-5 und in zwei Proben TPO-7 nachweisen. Zusätzlich zeigten sich sehr schwache Banden, die sich keiner der bekannten TPO-Isoformen zuordnen ließen. Hinsichtlich der Spleißvarianten und auch der Stärke ihrer Ausprägung fand sich nur ein geringer Unterschied zwischen Leber und Kolon. Die TPO-1-Bande war sowohl bei den Darmproben als auch in der Leber etwas stärker als die Bande des TPO-2. TPO-3 war im Darm relativ schwach ausgeprägt, hingegen in der Leber in einer Probe sehr deutlich, bei einer weiteren Probe jedoch gar nicht ausgeprägt. TPO-5 und TPO-7 ließen wiederum keinen eindeutigen Unterschied erkennen.



**Abbildung 12:** Auftrennung von TPO in einzelne Isoformen mit dem Primer TPOs. Eine sehr differenzierte Auftrennung war im PAA-Gel möglich. Im Vergleich zu dem mitgelaufenen Standard zeigten sich die bekannten TPO-Isoformen 1, 2, 3, 5 und 7. Eine eindeutige Differenz zwischen den verschiedenen untersuchten Geweben ließ sich nicht nachweisen. *CLC* – kompensierte Leberzirrhose, *DLC* – dekompenzierte Leberzirrhose, *K1-K5* – Kolon, *N* - Negativkontrolle

#### 4.8 Sequenzanalyse der Kolonbiopsate und Vergleich mit TPO-mRNA aus der Leber der Ratte

Das mit dem Primer hTPOfs amplifizierte PCR-Produkt wurde sequenziert. Die Sequenz weist eine 98%-ige Homologie mit der des Erstbeschreibers de Sauvage [39] auf.

hTPOfs	1	-----CCTACTCTGCC-AG
de Sauvage	61	TCTCCACCCGGATAGATTCTCACCCCTTGGCCCCGCCTTTGCCCCACCCTACTCTGCCAG
hTPOfs	14	AAGTGCA-GAGCCTAAGCCGCTCCATGGCCCCAGGAAGGATTGAGGGAGAGGCCCAA
de Sauvage	121	AAGTGCAAGAGCCTAAGCCGCTCCATGGCCCCAGGAAGGATTGAGGGAGAGGCCCAA
hTPOfs	73	ACAGGGAGCCACGCCAGCCAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCG
de Sauvage	181	ACAGGGAGCCACGCCAGCCAGACACCCCGGCCAGAATGGAGCTGACTGAATTGCTCCTCG
hTPOfs	133	TGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTG
de Sauvage	241	TGGTCATGCTTCTCCTAACTGCAAGGCTAACGCTGTCCAGCCCGGCTCCTCCTGCTTGTG
hTPOfs	193	ACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGC GACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGCC
de Sauvage	301	ACCTCCGAGTCCTCAGTAAACTGCTTCGT GACTCCCATGTCCTTCACAGCAGACTGAGCC
hTPOfs	253	AGTGCCAGAGGCTCACCCCTTGTCTACACCTGTTCTGCTGCCTGCTGTGGAC-----
de Sauvage	361	AGTGCCAGAGGTCACCCCTTGTCTACACCTGTTCTGCTGCCTGCTGTGGACTTTAGCT

**Abbildung 13:** Vergleich der TPOfs-amplifizierten TPO-Sequenz mit der Sequenz des Erstbeschreibers de Sauvage.

Die Transkription der ermittelten Nukleotidsequenz ergab als Protein übersetzt:

```

XXYSARSAEP KPPPWPQEGF RGEAPNREPR QPDTPARMEL TELLVVMMLL
LTARLTLSSP APPACDLRVL SKLLRDSHVL HSRLSQPEA HPLSTPVLLP AVD

```

**Abbildung 14:** Übersetzung der Nukleotidsequenz der Kolonschleimhaut in ein Protein

Die übersetzte Proteinsequenz (mittels des SWISS-PROT EXPASY, Internet-Seite <http://www.isb-sib.ch/>) ergab eine hohe Homologie mit der bereits bekannten TPO-Proteinsequenz aus der Leber der Ratte (SWISS-PROT-EXPASY-Nummer P49 745), eine weitere Homologie mit der TPO-Sequenz aus der Niere von *canis familiaris* (Nummer P42 705).

## 5. Diskussion

Reaktive Thrombozytosen sind ein typisches Erscheinungsmerkmal chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Es besteht eine strenge Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und der Erkrankungsaktivität bei Patienten mit M. Crohn [62]. Bei reaktiven Thrombozytosen, beispielsweise im Rahmen einer CED besteht im Gegensatz zu primären Thrombozytosen gleichzeitig eine Erhöhung des Mediators TPO [51]. Cerutti [47] beschreibt bei Patienten nach Hüftersatz einen Anstieg des TPO, der 11 Tage später von einem Anstieg der Thrombozytenzahl gefolgt wird. Bei gesunden Probanden und auch bei Patienten mit essentieller Thrombozytämie [45] ist eine negative Korrelation zwischen TPO und Thrombozytenzahl bekannt. Wolber [63] geht von einer konstanten TPO-mRNA-Expression in der Leber aus. Die Höhe des im Blut zirkulierenden TPO ist von der Bindung an seinen Rezeptor cMpl, welcher auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert wird, der Internalisierung und Degradierung in den Thrombozyten abhängig [64-67]. Der Mechanismus, aufgrund dessen sich bei reaktiven Thrombozytosen dennoch ein erhöhter TPO-Serumspiegel findet, ist nicht geklärt [68].

Die in dieser Studie untersuchten Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weisen klinisch und laborchemisch ein weites Verteilungsmuster von Remission bis hin zu schweren Krankheitszuständen auf. Die Krankheitsaktivität der CED-Patienten wurde entsprechend ihrer Diagnose nach dem PCDAI oder CUIAI berechnet.

Im Falle der CU-Patienten besteht jedoch kein speziell auf die pädiatrische Klientel angepasster Index. Der hier verwendete Index legt ein großes Gewicht auf extraintestinale Manifestationen, die bei Kindern nur selten zu finden sind, so dass sich 80 % der CU-Patienten in dieser Studie trotz eines klinisch teilweise schlechten Zustandes und einer häufig hohen Medikation dem Index nach in Remission befinden.

Bei der Betrachtung des Serum-TPO-Spiegels fällt die große Bandbreite sowohl bei den Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als auch in der Kontrollgruppe auf. Jedoch finden sich die höchsten Einzelwerte bei Patienten mit MC. Auch der Median liegt hier höher als bei den anderen Patientengruppen. Dies steht mit der bekannten Beobachtung im Einklang, dass Akutephaseproteine beim

Morbus Crohn im Gegensatz zur Colitis ulcerosa erhöht sind [69]. Statistisch konnte in dieser Arbeit die Erhöhung des Serum-TPO bei MC-Patienten gegenüber anderen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nach dem Wilcoxon-Test nicht signifikant nachgewiesen werden, ein Trend war jedoch erkennbar. Eine Ursache für die fehlende statistische Signifikanz könnte einerseits durch die geringe Fallzahl, andererseits durch ein Übergewicht von Patienten in Remission begründet sein.

Es besteht eine positive Korrelation zwischen TPO-Werten und dem PCDAI [55]. MC-Patienten in Remission haben niedrigere Serum-TPO-Spiegel als Patienten im schweren Schub. Dagegen lässt sich keine Korrelation zwischen TPO-Werten und dem CUIAI [54] aufzeigen. Dies könnte auf den eingesetzten Index zurückzuführen sein, der, wie schon oben beschrieben, nur bedingt für pädiatrische Patienten einsetzbar ist. Ein akuter Schub einer Colitis ulcerosa geht allerdings deutlich seltener als beim MC mit einer Erhöhung der Akutephaseproteine einher.

In dieser Studie zeigt sich eine positive Korrelation zwischen Serum-TPO-Spiegeln und Thrombozytenzahlen, wobei bei MC-Patienten die Thrombozytenzahlen im Vergleich zu CU-Patienten deutlich stärker ansteigen.

Weiterhin findet sich eine positive Korrelation zwischen TPO- und CRP-Werten, eine negative Korrelation zwischen den Spiegeln für TPO und Albumin. Keine signifikanten Korrelationen konnten zwischen den Werten für TPO und BSG sowie TPO und Leukozyten aufgezeigt werden. Beim derzeitigen Untersuchungsstand ist es unklar, warum zwischen einigen Entzündungsparametern signifikante Korrelationen mit dem TPO-Spiegel bestehen, bei anderen jedoch nicht. Cerutti [70] beschreibt in einer 1997 erschienen Arbeit einen Trend zu einer Korrelation zwischen TPO und Akutephaseproteinen. 1999 postulieren Cerutti et al. [47], dass sich TPO wie ein APP verhält und zeigen eine schwach signifikante Korrelation zwischen Plasma-TPO und der BSG, sowie Plasma-TPO und CRP. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, d.h. sowohl die Korrelation zwischen TPO und verschiedenen APP als auch die Korrelation zwischen TPO und dem PCDAI stimmen mit Ausnahme der fehlenden Korrelation zwischen TPO und der BSG mit Ceruttis Ergebnissen überein.

Aufgrund der Korrelation zwischen Serum-TPO und dem PCDAI stellt sich die Frage, inwieweit sich der TPO-Spiegel als Marker für die Aktivität der Morbus-Crohn-Erkrankung einsetzen lässt. Erhöhte Thrombozytenpiegel sind ein Merkmal von

Entzündungsreaktionen. Die Thrombozytenzahl wird in die Einschätzung des Schweregrades einer CED mit einbezogen. Thrombopoetin ist der Mediator für einen Anstieg der Thrombozyten und geht diesem Anstieg zeitlich voraus [48]. Insofern könnte die Bestimmung des TPO-Spiegels eher eine Aussage über die aktuelle Aktivität der Erkrankung ermöglichen.

Exemplarisch konnte bei zwei MC-Patienten, die aufgrund eines schweren Krankheitsverlaufes im Untersuchungszeitraum mehrfach vorstellig wurden, gezeigt werden, dass eine Zustandsverschlechterung mit jeweils mit höheren TPO-Spiegeln einherging.

Vorteile, die TPO im Rahmen der Diagnostik und zur Einschätzung des Schweregrades von CED bieten könnten, werden durch Probleme bei der Bestimmung des TPO-Spiegels eingeschränkt. Im Rahmen dieser Studie war die Erhebung reproduzierbarer Werte mit einem kommerziellen ELISA-Kit nicht möglich. Verwendet wurde der im Methodenteil beschriebene ELISA des CLB in Amsterdam, der nicht auf dem Markt verfügbar ist. Die TPO-Spiegel-Bestimmung wird zurzeit noch fast ausschließlich im Rahmen von Studien eingesetzt, und es scheint zumindest derzeit eine klinische Anwendung der TPO-Testung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dem apparativen und finanziellen Aufwand noch nicht angemessen. Sicherlich ist auch weiterhin die Diagnostik des Morbus Crohn wie auch die Beurteilung des Schweregrades nur in der Zusammenschau von Klinik, apparativer Diagnostik und Laborparametern möglich.

Ishiguro et al. [71] beschreiben, dass das TPO im Serum zwei Tage nach Geburt am höchsten ist und dann kontinuierlich bis auf die bei Erwachsenen bekannten Werte abnimmt. Signifikant hohe Werte treten im ersten Lebensmonat auf. In der hier vorliegenden Studie ist keine Korrelationen zwischen dem TPO-Serumspiegel und dem Patientenalter festzustellen. Diese divergenten Aussagen lassen sich am ehesten dadurch erklären, dass die vorliegende Studie keine Patienten in den ersten Lebensmonaten einschloss. Auch könnten Abweichungen im Studiendesign eine Rolle spielen. Da das Lebensalter nach den Daten dieser Studie keinen Einfluss auf die Höhe des TPO-Spiegels zu haben scheint, wurde es in den weiteren

Auswertungen nicht weiter berücksichtigt. Weiterhin traten auch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf.

Die Medikation der Patienten wurde nicht berücksichtigt. Auch wenn letztendlich die Frage, ob eine Beeinflussung besteht nicht abschließend geklärt werden konnte, fanden Kocak et al. in einer Untersuchung von Kindern mit ITP (immune thrombozytopenic purpura) weder einen Einfluss von Steroiden noch Immunglobulinen auf TPO-Spiegel [72].

Nakanishi hat eine TPO-mRNA-Expression im Kolonepithel von Ratten beschrieben [53]. Laut Wolber [50] werden 95 % der TPO-mRNA in der Leber exprimiert. Da diese Expression jedoch als konstant beschrieben wird [63], und der Serum-TPO-Spiegel bei reaktiven Thrombozytosen, wie sie im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen entstehen, eindeutig erhöht ist, versucht diese Studie die Frage zu beantworten, inwieweit ein extrahepatischer Manifestationsort, z.B. das entzündete Kolon für die gesteigerte TPO-Sekretion verantwortlich ist. Generell gilt die Leber als Hauptproduktionsort [50], aber beim Menschen wurde auch in Niere, Knochenmark, Milz, Gehirn und Plazenta [39, 41, 50, 73] TPO-mRNA gefunden.

In nahezu allen Kolonbiopsaten ist eine TPO-mRNA-Expression nachzuweisen. Das sequenzierte PCR-Produkt war mit TPO homolog. Einzelne Basenaustausche, wie sie im Rahmen der Untersuchungen gefunden wurden, sind als Normvarianten oder als Messungenauigkeiten im Rahmen von Lesefehlern beim Sequenzieren interpretierbar. So weisen im Sequenziergerät z.B. die Basen Thymin und Cytosin, sowie die Basen Guanin und Adenin ein sehr ähnliches Spektrum auf.

Die Biopsate schließen die gesamte Mukosa des Kolons mit ein. Da die Proben vor der RNA-Extraktion homogenisiert werden, erlaubt diese Studie keine Aussage, über den Ort der TPO-Synthese innerhalb der Kolonschleimhaut. Auch kann in diesem Rahmen nicht bewiesen werden, dass die TPO-mRNA-Expression in ortständigen Zellen erfolgt. Jedoch wurde, um eine Kontamination von TPO aus im Rahmen der Entzündungsreaktion eingewanderten Leukozyten auszuschließen, Buffycoat auf eine TPO-mRNA-Expression untersucht. In der Literatur gibt es hierfür bislang weder positive noch negative Daten. In den untersuchten Leukozyten konnte keine TPO-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Auch wenn nicht

vollkommen auszuschließen ist, dass die Zellen bei der Migration vom Blut ins Gewebe die Fähigkeit zur TPO-mRNA-Expression erwerben, gibt es bislang keine Hinweise hierfür, so dass als wahrscheinlichster Ort für die TPO-Synthese ortständige Zellen im Kolon angenommen werden können.

Es konnte in 13 von 16 ausgewerteten Biopsaten TPO nachgewiesen werden. Die Signale waren jedoch so schwach, dass eine Quantifizierung mittels kompetitiver PCR nicht möglich war. Als Vergleich dienten daher Leberbiopsate eines Patienten mit bekannter TPO-mRNA-Konzentration [50]. Die TPO-mRNA-Konzentrationen im Kolon wurden durch Vergleich mit einer Verdünnungsreihe der Leberprobe ermittelt und lagen zwischen 0,17-0,34 amol TPO-mRNA/ $\mu$ g Gesamt-RNA. Das entspricht 1/100–1/200 des Wertes der Leberprobe. Klare Unterschiede ergaben sich in der Signalaktivität einzelner Proben (siehe Abbildung 10). Eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression der Proben und der Diagnose, bzw. der Krankheitsaktivität fand sich nicht. Darüber hinaus ließen sich keine Unterschiede zwischen Gesunden und Kranken aufzeigen.

Die TPO-mRNA-Expression im Kolon ist im Vergleich zur Leber sehr schwach. Hieraus ist zu schließen, dass die gefundene TPO-mRNA-Expression in der Kolonschleimhaut nicht für eine alleinige Erklärung des erhöhten TPO-Serumspiegels bei Patienten mit CED ausreicht. Inwieweit es als Kofaktor anzusehen ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Wolber et al. beschreiben, dass HepG2-Zellen, wenn sie mit IL-6 stimuliert werden, einen dosisabhängigen Anstieg der TPO-Expression aufweisen. Andere Interleukine wie z.B. IL-11 scheinen keinen Einfluss auf die TPO-Expression zu haben [49]. In einer anderen Arbeit führt die Stimulation von Leberparenchymzellen (HepG2-Zellen) mit TGF $\beta$ , Activin A, PDGF, HGF, aber auch mit IL-6 nicht zu einem signifikanten Effekt auf die TPO-mRNA-Expression [74]. Auch Yamashita findet keinen Einfluss von IL-6 auf die TPO-mRNA-Expression in Rattenleberzellen [75]. Kaser zeigt, dass die Gabe von IL-6 bei Tumorpatienten von einem Anstieg des TPO-Plasma-Spiegels gefolgt wird und nimmt daher an, dass die Anzahl der Megakaryozyten und Thrombozyten nicht der einzige Regulationsfaktor des zirkulierenden TPO ist [76].

Die Studienergebnisse sind widersprüchlich. Es ist jedoch vorstellbar, dass es trotz der normalerweise als konstant beschriebenen TPO-mRNA-Expression in der Leber IL-6 vermittelt zu einem Anstieg der TPO-Synthese kommt. Wir nehmen an, dass der Abbau von TPO über Bindung an seinen Rezeptor, Internalisierung und Degradierung die vermehrte TPO-Produktion nicht kompensieren kann, und es somit nicht nur zu einer Aufhebung der negativen sondern sogar zu dieser positiven Korrelation zwischen TPO und Thrombozytenzahl kommt.

Die Kolonbiopsate wurden auf das Vorkommen des TPO-Rezeptors cMpl untersucht [37]. Es fanden sich schwach positive Signale, sowohl in den Leberproben als auch in der Leukozyten-mRNA. Es konnten jedoch keine cMpl-RNA in den Darmproben nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen eine parakrine oder autokrine Wirkung des im Kolon exprimierten TPO unwahrscheinlich werden.

Chang [42] beschreibt drei verschiedene TPO-Isoformen (TPO-1-3) in der Leber. Sasaki et al. [77] fügen 1999 TPO-4–6 hinzu. Wu et al. beschreiben bei der Maus neun verschiedene Isoformen [78]. Alle Isoformen entstehen durch unterschiedliches Spleißen im letzten Exon.

Im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt zeigen sowohl Darm- als auch Leberproben bekannte Spleißvarianten. In der Intensität zeigen sich leichte Unterschiede, jedoch finden sich auch zurzeit nicht erklärbare Intensitätsunterschiede innerhalb der verschiedenen Darmproben. Zwei weitere Banden stimmen ihrer Länge nach mit den von Wu et al. beschriebenen Isoformen TPO-5 und TPO-7 überein [78]. Beide Spleißvarianten sind in der Literatur allerdings erst bei der Maus und noch nicht beim Menschen beschrieben worden. Insgesamt zeigt sich hinsichtlich der Spleißvariantenformen und auch der Stärke ihrer Ausprägung nur ein geringer Unterschied zwischen Leber und Kolon. Die TPO-1-Bande ist sowohl im Darm als auch in der Leber etwas stärker als die Bande von TPO-2. TPO-3 ist im Darm relativ schwach ausgeprägt, bei der Leber in einer Probe sehr deutlich, in einer weiteren Probe jedoch gar nicht nachweisbar. TPO-5 und TPO-7 lassen wieder keinen eindeutigen Unterschied erkennen.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Ausprägung der unterschiedlichen Isoformen in Leber und Kolonschleimhaut zumindest nicht stark voneinander abweicht. Inwieweit die in dieser Studie gefundenen Unterschiede im

Verteilungsmuster der Isoformen relevant sind, müsste in einer weiteren Studie mit größerem Patientenkollektiv geklärt werden.

## 6. Zusammenfassung

Das Glykoprotein Thrombopoetin (TPO) ist der Hauptmediator der Thrombopoese. TPO wird zum großen Teil in der Leber exprimiert. Die TPO-mRNA-Expression in der Leber wurde lange Zeit als konstant angesehen. Thrombozyten sind am Abbau des Hormons beteiligt, was zu einer inversen Korrelation zwischen dem TPO-Serumspiegel und der Thrombozytenzahl führt. Abweichend hierzu führen Entzündungsreaktionen allerdings sowohl zu einer Erhöhung des TPO-Spiegels, als auch der Thrombozytenzahl.

Eine TPO-mRNA-Expression im Kolon ist bei Ratten beschrieben. Anhand von PCR-Untersuchungen von Kolonbiopsaten soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, inwieweit das Kolon als extrahepatischer Produktionsort für die gesteigerte Thrombopoese in Frage kommt. Mittels kompetitiver PCR wurde die Korrelation zwischen TPO-mRNA-Expression im Kolon und dem Serum-TPO untersucht. ELISA-Techniken dienten der Bestimmung des TPO-Spiegels im Serum, der mit weiteren Entzündungsparametern verglichen wurde.

Erstmals konnte eine TPO-mRNA-Expression im menschlichen Darm nachgewiesen werden. Spleißvariantenanalysen zeigten weiterhin, dass die TPO-Isoformen des Darms und der Leber weitgehend übereinstimmen.

In der statistischen Auswertung fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen TPO-mRNA-Expression und klinischen Daten der Patienten bzw. der Krankheitsaktivität. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass die TPO-Expression im Kolon nicht für die Thrombozytose bei CED verantwortlich ist.

Die Funktion des im Kolon gebildeten Thrombopoetins ist nicht geklärt. Wir konnten jedoch zeigen, dass keine Thrombopoetinrezeptoren (cMpl-Rezeptor) in der Kolonschleimhaut exprimiert werden und das Hormon damit keine parakrine oder autokrine Wirkung in der Mukosa besitzt.

Der Einsatz von ELISA-Techniken erbrachte den Nachweis einer positiven Korrelation zwischen TPO-Spiegel und der Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn, aber nicht der bei der Colitis ulcerosa. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung überein, dass ein Schub eines MC mit einem stärkeren Anstieg der Entzündungsparameter einhergeht. Darüber hinaus ließ sich eine positive Korrelation zwischen TPO und verschiedenen Akutephaseproteinen (APP) nachweisen, so dass TPO selbst als APP angesehen werden kann.

## 7. Literaturverzeichnis

1. de Dombal, F.T., *Ulcerative Colitis, Epidemiology and Aetiology, Course and Prognosis*, in *Brit Med J*. 1971. p. 649-650.
2. Mettler, C.C., *History of Medicine*. 1947, Blakiston: Philadelphia.
3. Grand, R.J. and D.R. Homer, *Approaches to inflammatory bowel disease in childhood and adolescence*, in *Pediatr Clin North Am*. 1975. p. 835-50.
4. Rokitsansky, K., *A Manual of Pathologic Anatomy*. Sydenham Society ed. Vol. 4. Vol., London. 1849-1854.
5. Virchow, R.L.D., *Die krankhaften Geschwuelste*. Vol. 3. 1863, Berlin.
6. Helmholtz, H.F., *Chronic ulcerative colitis in childhood*, in *Am J Dis Child*. 1923. p. 418-430.
7. Luecking, T., *Regionale Enteritis im Kindesalter*, in *M Schr Kinderheilk*. 1969. p. 57-60.
8. Chong, S.K., et al., *Chronic inflammatory bowel disease in childhood*. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1982. **284**(6309): p. 101-3.
9. Chong, S.K., et al., *Histological diagnosis of chronic inflammatory bowel disease in childhood*. *Gut*, 1985. **26**(1): p. 55-9.
10. Chong, S.K. and J.A. Walker-Smith, *Chronic inflammatory bowel disease in the young*. *Compr Ther*, 1982. **8**(10): p. 27-34.
11. Hyams, J.S., et al., *Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 1993. **104**(5): p. 1285-92.
12. Halligan, S., et al., *The distribution of small bowel Crohn's disease in children compared to adults*. *Clin Radiol*, 1994. **49**(5): p. 314-6.
13. Blaker, F., K.H. Schafer, and M.A. Lassrich, [*Ulcerative and granulomatous colitis in children (author's transl)*], in *Monatsschr Kinderheilkd*. 1978. p. 411-8.
14. Blaker, F., *The basis of immunosuppressive treatment in ulcerative colitis*, in *Prog Pediatr Surg*. 1978. p. 41-7.
15. Merkle, P., T. Heil, and C. Herfarth, [*Diagnostic and therapeutic aspects of gastroduodenal Crohn disease*], in *Chirurg*. 1981. p. 758-62.
16. Tremaine, W.J., *Diagnosing collagen colitis: does it make a difference?* *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1999. **11**(5): p. 477-9.
17. Burdelski, M., et al., *Endoscopic criteria of Crohn's disease in childhood and adolescence*. *Z Kinderchir*, 1988. **43 Suppl 1**: p. 61-2.
18. Burdelski, M. and H.G. Posselt, [*Indications and diagnostic criteria for endoscopy in Crohn's disease in childhood*]. *Monatsschr Kinderheilkd*, 1981. **129**(3): p. 137-8.
19. Duchmann, R., M.F. Neurath, and K.H. Meyer zum Buschenfelde, *Responses to self and non-self intestinal microflora in health and inflammatory bowel disease*. *Res Immunol*, 1997. **148**(8-9): p. 589-94.
20. Macpherson, A., et al., *Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria*. *Gut*, 1996. **38**(3): p. 365-75.
21. Nielsen, O.H., et al., *Involvement of interleukin-4 and -10 in inflammatory bowel disease*. *Dig Dis Sci*, 1996. **41**(9): p. 1786-93.
22. Nielsen, O.H. and J. Rask-Madsen, *Mediators of inflammation in chronic inflammatory bowel disease*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1996. **216**: p. 149-59.
23. Sartor, R.B., *Cytokine regulation of experimental intestinal inflammation in genetically engineered and T-lymphocyte reconstituted rodents*. *Aliment Pharmacol Ther*, 1996. **10 Suppl 2**: p. 36-42; discussion 43-4.

24. Sartor, R.B., H. Herfarth, and E.A.F. Van Tol, *Bacterial Cell Wall Polymer-Induced Granulomatous Inflammation*. *Methods*, 1996. **9**(2): p. 233-47.
25. Sartor, R.B., et al., *Animal models of intestinal and joint inflammation*. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1996. **10**(1): p. 55-76.
26. Carter, M.J., A.J. Lobo, and S.P. Travis, *Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults*, in *Gut*. 2004. p. V1-16.
27. Travassos, W.J. and A.S. Cheifetz, *Infliximab: Use in Inflammatory Bowel Disease*, in *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2005. p. 187-196.
28. Schapira, M., et al., *Thromboembolism in inflammatory bowel disease*. *Acta Gastroenterol Belg*, 1999. **62**(2): p. 182-6.
29. Novacek, G., et al., *Thromboembolism and resistance to activated protein C in patients with inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(3): p. 685-90.
30. Novacek, G., et al., *Changes in blood rheology caused by Crohn's disease*. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1996. **8**(11): p. 1089-93.
31. Papa, A., et al., *Review article: inherited thrombophilia in inflammatory bowel disease*. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(6): p. 1247-51.
32. Papa, A., et al., *Thrombopoietin serum levels in patients with inflammatory bowel disease with and without previous thromboembolic events*. *Hepatogastroenterology*, 2003. **50**(49): p. 132-5.
33. Foster, D.C., et al., *Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(26): p. 13023-7.
34. Gurney, A.L., et al., *Genomic structure, chromosomal localization, and conserved alternative splice forms of thrombopoietin*. *Blood*, 1995. **85**(4): p. 981-8.
35. Suzukawa, K., et al., *The human thrombopoietin gene is located on chromosome 3q26.33-q27, but is not transcriptionally activated in leukemia cells with 3q21 and 3q26 abnormalities (3q21q26 syndrome)*. *Leukemia*, 1995. **9**(8): p. 1328-31.
36. Odell, T.T., Jr., D.T. Mc, and T.C. Detwiler, *Stimulation of platelet production by serum of platelet-depleted rats*, in *Proc Soc Exp Biol Med*. 1961. p. 428-31.
37. Vigon, I., et al., *Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(12): p. 5640-4.
38. Methia, N., et al., *Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis*. *Blood*, 1993. **82**(5): p. 1395-401.
39. de Sauvage, F.J., et al., *Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand*, in *Nature*. 1994. p. 533-8.
40. Bartley, T.D., et al., *Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl*. *Cell*, 1994. **77**(7): p. 1117-24.
41. Lok, S., et al., *Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo*. *Nature*, 1994. **369**(6481): p. 565-8.
42. Chang, M.S., et al., *Cloning and characterization of the human megakaryocyte growth and development factor (MGDF) gene*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(2): p. 511-4.
43. Kato, T., *Protein characteristics of thrombopoietin*. *Stem Cells*, 1996. **14 Suppl 1**: p. 139-47.
44. Folman, C.C., *Thrombopoietin: Its Ups and Downs*. 2001, University of Amsterdam: Amsterdam.

45. Tomita, N., et al., *Strong inverse correlation between serum TPO level and platelet count in essential thrombocythemia*. Am J Hematol, 2000. **63**(3): p. 131-5.
46. Kuter, D.J. and R.D. Rosenberg, *The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit*. Blood, 1995. **85**(10): p. 2720-30.
47. Cerutti, A., et al., *Circulating thrombopoietin in reactive conditions behaves like an acute phase reactant*. Clin Lab Haematol, 1999. **21**(4): p. 271-5.
48. Folman, C.C., et al., *The role of thrombopoietin in post-operative thrombocytosis*. Br J Haematol, 2001. **114**(1): p. 126-33.
49. Wolber, E.M. and W. Jelkmann, *Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(5): p. 499-506.
50. Wolber, E.M., et al., *Expression of the thrombopoietin gene in human fetal and neonatal tissues*. Blood, 1999. **94**(1): p. 97-105.
51. Heits, F., et al., *Elevated serum thrombopoietin and interleukin-6 concentrations in thrombocytosis associated with inflammatory bowel disease*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(7): p. 757-60.
52. Kapsoritakis, A.N., et al., *Elevated thrombopoietin serum levels in patients with inflammatory bowel disease*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(12): p. 3478-81.
53. Nakanishi, K., et al., *Thrombopoietin expression in normal and hypobaric hypoxia-induced thrombocytopenic rats*. Lab Invest, 1999. **79**(6): p. 679-88.
54. Rachmilewitz, D., *Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial*. Bmj, 1989. **298**(6666): p. 82-6.
55. Harms, H.K., et al., *A paediatric Crohn's disease activity index (PCDAI). Is it useful? Study Group on Crohn's Disease in Children and Adolescents*. Acta Paediatr Suppl, 1994. **83**(395): p. 22-6.
56. Folman, C.C., et al., *Sensitive measurement of thrombopoietin by a monoclonal antibody based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*, in *Thromb Haemost*. 1997. p. 1262-7.
57. Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, New York, USA.
58. Sohma, Y., et al., *Molecular cloning and chromosomal localization of the human thrombopoietin gene*, in *FEBS Lett*. 1994. p. 57-61.
59. Ercolani, L., et al., *Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene*, in *J Biol Chem*. 1988. p. 15335-41.
60. Chang, M.S., et al., *Cloning and characterization of the human megakaryocyte growth and development factor (MGDF) gene*, in *J Biol Chem*. 1995. p. 511-4.
61. Wu, X., M. Nakayama, and J.W. Adamson, *Identification of five new isoforms of murine thrombopoietin mRNA*, in *Biochem Biophys Res Commun*. 2000. p. 137-43.
62. Harries, A.D., et al., *Platelet count: a simple measure of activity in Crohn's disease*. Br Med J (Clin Res Ed), 1983. **286**(6376): p. 1476.
63. Wolber, E.M. and W. Jelkmann, *Thrombopoietin: the novel hepatic hormone*. News Physiol Sci, 2002. **17**: p. 6-10.
64. Fielder, P.J., et al., *Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2154-61.
65. Nagata, Y., et al., *Serum thrombopoietin level is not regulated by transcription but by the total counts of both megakaryocytes and platelets during thrombocytopenia and thrombocytosis*. Thromb Haemost, 1997. **77**(5): p. 808-14.

66. Nagata, Y., et al., *Regulation of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin and stromal cells*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 435-8.
67. Verbeek, W., et al., *Measurement of thrombopoietic levels: clinical and biological relationships*. Curr Opin Hematol, 2000. **7**(3): p. 143-9.
68. Wolber, E.M. and W. Jelkmann, *Thrombopoietin: the novel hepatic hormone*, in *News Physiol Sci*. 2002. p. 6-10.
69. Raddatz, D., M. Bockemuhl, and G. Ramadori, *Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(5): p. 547-57.
70. Cerutti, A., et al., *Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis*. Br J Haematol, 1997. **99**(2): p. 281-4.
71. Ishiguro, A., et al., *Age-related changes in thrombopoietin in children: reference interval for serum thrombopoietin levels*. Br J Haematol, 1999. **106**(4): p. 884-8.
72. Kocak, U., T. Gursel, and G. Ozturk, *The effect of steroid and intravenous immunoglobulin on thrombopoietin levels in pediatric patients with immune thrombocytopenic purpura*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2000. **11**(2): p. 121-5.
73. Stoffel, R., A. Wiestner, and R.C. Skoda, *Thrombopoietin in thrombocytopenic mice: evidence against regulation at the mRNA level and for a direct regulatory role of platelets*. Blood, 1996. **87**(2): p. 567-73.
74. Hino, M., et al., *Constitutive expression of the thrombopoietin gene in a human hepatoma cell line*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **217**(2): p. 475-81.
75. Yamashita, K., et al., *Hepatocyte growth factor/scatter factor enhances the thrombopoietin mRNA expression in rat hepatocytes and cirrhotic rat livers*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(1): p. 83-90.
76. Kaser, A., et al., *Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2720-5.
77. Sasaki, Y., et al., *Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1952-60.
78. Wu, X., M. Nakayama, and J.W. Adamson, *Identification of five new isoforms of murine thrombopoietin mRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(1): p. 137-43.

## 8. Lebenslauf

Claudia Fridrike Stute  
Marlesgrube 63  
23552 Lübeck  
E-Mail: stute@paedia.ukl.mu-luebeck.de

Geburtsdatum/-ort	21. März 1977 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
1983 – 1996	Grundschule Frahmstraße Rudolf Steiner Schule-Nienstedten Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1996 – 1997	Freiwilliges Soziales Jahr
1997 – 2004	Universität Hamburg: Studiengang Medizin
09/1999	Physikum
09/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
07/2004 – 09/2004	ÄIP, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Seit 10/2004	Assistenzärztin, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck

### Auslandsaufenthalte

08/2001 – 09/2001	Famulatur, CICU, Great Ormond Street Hospital for Children, London
06/2003 – 08/2003	Praktisches Jahr, Dept. of Surgery, Trinity College, Dublin
10/2003 – 12/2003	Praktisches Jahr, Cardiologie Pédiatrique, Hôpital Necker Enfants Malades, Paris

## 9. Publikationen

### 9.1 Abstracts

**Stute F**, Ganschow R, Wolber EM, Jelkmann W, Burdelski M. mRNA Expression of thrombopoietin in colon biopsies of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34: 461

**Stute F**, Ganschow R, Wolber EM, Jelkmann W, Burdelski M. Thrombopoietin-mRNA-Expression in Kolonbiopsien von Kindern mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Monatsschr Kinderheilk* 2002; 3: 379-380

**Stute F**, Ganschow R, Folman C, von dem Borne A, Burdelski M. Serumthrombopoietin bei Kindern mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Monatsschr Kinderheilk* 2002; 3: 384

### 9.2 Poster

**Stute F**, Ganschow R, Folman C, von dem Borne A, Burdelski M. Serumthrombopoietin bei Kindern mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Jahrestagung der Norddeutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde 2002*

## 10. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. M. Burdelski für die Bereitstellung des Themas, für seine fachkundige Betreuung bei inhaltlichen und organisatorischen Fragen und für die Hilfe bei der Präsentation und Publikation der Ergebnisse. Herrn PD Dr. med. R. Ganschow danke ich für die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten sowie die Anleitung zum Verfassen der Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. E.-M. Wolber danke ich für die Einführung in die Methodik der RNA-Extraktion, der qualitativen und kompetitiven PCR und die Begleitung der Experimente. Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. W. Jelkmann für sein fortwährendes Interesse an dieser Arbeit, seinen fachkundigen Rat, sowie dafür, dass ich den überwiegenden Teil der Experimente in seinem Labor durchführen konnte.

Ein weiterer Dank geht an Frau C. C. Folman (PhD) und Herrn Prof. van dem Borne in Amsterdam für Ihre Unterstützung und die Bereitstellung Ihres Labors für den ELISA.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. N. Soehendra sowie Herrn Prof. Dr. med. A. Raedler für die Unterstützung bei der Gewinnung von Patientenmaterial.

Nicht zuletzt danke ich der Abteilung für pädiatrische Gastroenterologie des UKE sowie den Mitarbeitern des Institutes für Physiologie in Lübeck für vielerlei Rat und eine angenehme Zusammenarbeit.

## 11. Geräte- und Reagenzienverzeichnis

### 11.1 Geräte

Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
DNA Thermal Cycler	PE Biosystems, Foster City, California
E.A.S.Y. Gel-Dokumentationssystem	Herolab, Wiesloch
Kühlzentrifuge RC-5B	Sorvall, Bad Homburg
Microcentrifuge MC-13	Millipore/Amicon, Eschborn
MicroLumat LB96P	EG&G Berthold, Bad Wildbad
Minifuge GL	Heraeus Instruments, Hanau
Polytron-Homogenisator	Kinematica, Luzern, Schweiz
Rainbow-Mikrotiterplatten-Photometer	SLT Labinstrumente, Crailsheim
Rotoren GSA und SS-34	Sorvall, Bad Homburg
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
UV-Photometer GeneQuant II	Pharmacia, Cambridge, Großbritannien

### 11.2 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien oder Reagenzien bei Sigma (Deisenhofen), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) im höchstmöglichen Reinheitsgrad erworben. Ausnahmen waren:

1 kb <sup>+</sup> DNA Standard	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
100 bp DNA Standard	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase-freie RNase	Promega, Mannheim
dNTPs	Takara Biomedicals, Shiga, Japan
epidermaler Wachstumsfaktor	Sigma, Deisenhofen

Ethidiumbromid	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
oligo(dT) <sub>15</sub>	MWG Biotech, Ebersberg
PCR-Startermoleküle	MWG Biotech, Ebersberg
reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
RNase-freie DNase I	Takara Biomedicals, Shiga, Japan
rNTPs	Promega, Mannheim
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T7-RNA-Polymerase	Takara Biomedicals, Shiga, Japan
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

### 11.3 Puffer und Lösungen

#### PBS-Puffer:

8,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

137 mM  $\text{NaCl}$

3 mM  $\text{KCl}$

mit 85% (v/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  auf pH 7,3 einstellen

autoklavieren oder sterilfiltrieren

#### SDS-Lösung:

0,1 M  $\text{NaOH}$

0,5% (w/w)  $\text{SDS}$

#### GTC-Lösung:

4 M  $\text{GTC}$

25 mM  $\text{Natriumacetat}$

filtrieren mit Whatman-Filter No. 1

0,1 M  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### Natriumacetat-Puffer:

2 M  $\text{Natriumacetat}$ , pH 4,0

autoklavieren

Phenol: (Fertiglösung von Sigma)

Phenol

äquilibriert mit 0,1 M Natriumcitrat, pH 4,3

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol: (Fertiglösung von Sigma)

50% (v/v) Phenol

48% (v/v) Chloroform

2% (v/v) Isoamylalkohol

äquilibriert mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA

75% (v/v) Ethanol:

75% (v/v) Ethanol

in DEPC-Wasser

DEPC-Wasser:

0,1% (v/v) DEPC in Wasser

über Nacht rühren, autoklavieren

RNA-Ladepuffer (1:1 mit Probe zu mischen):

40 mM MOPS, pH 7,0

10 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

7% (v/v) Formaldehyd

50% (v/v) Formamid

10% (v/v) Glycerin

0,05% (w/w) Bromphenolblau

40 µg/mL Ethidiumbromid

MOPS-Puffer:

40 mM MOPS, pH 7,0

10 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

autoklavieren

TAE-Puffer:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,0

1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer (1:10 mit Probe zu mischen):

10 mM	Tris-Acetat, pH 8,0
1 mM	EDTA
50% (v/v)	Glycerin
0,25% (w/w)	Bromphenolblau

TE-Puffer:

10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA

## 12. Abbildungsverzeichnis

### 12.1 Abbildungen

Abbildung 1: TPO-Spiegel im Serum.....	20
Abbildung 2: Korrelation zwischen Serum-TPO und PCDAI .....	21
Abbildung 3: Korrelation zwischen Serum-TPO und Thrombozytenzahl .....	22
Abbildung 4: Regression von Serum-TPO und Thrombozytenzahl .....	23
Abbildung 5: Korrelation zwischen TPO-Spiegel und PCDAI bei zwei MC- Patienten mit schwerem Krankheitsverlauf .....	24
Abbildung 6: Korrelation zwischen Serum-TPO und Albumin.....	25
Abbildung 7: GAPDH-mRNA-Expression im Kolongewebe.....	26
Abbildung 8: GAPDH-mRNA-Nachweis durch semiquantitative PCR.....	27
Abbildung 9: Nachweis von humanem TPO in der Kolonschleimhaut.....	28
Abbildung 10: Nachweis von humanem TPO in der Darmmukosa mit dem Primer hTPOfs .....	29
Abbildung 11: Nachweis der Expression des TPO-Rezeptors cMpl in Leber und Leukozyten .....	30
Abbildung 12: Auftrennung von TPO in einzelne Isoformen.....	31
Abbildung 13: Vergleich der TPOfs-amplifizierten TPO-Sequenz mit der Sequenz des Erstbeschreibers de Sauvage.....	32
Abbildung 14: Proteinsequenz des sequenzierten TPO .....	32

### 12.2 Tabellen

Tabelle 1: Berechnung des PCDAI nach Harms.. .....	9
Tabelle 2: Krankheitsaktivität bei Morbus Crohn nach dem PCDAI.....	9
Tabelle 3: Berechnung des CUIAI .....	10
Tabelle 4: Krankheitsaktivität bei Colitis ulcerosa nach dem CUIAI .....	10
Tabelle 5: Verwendete Primer. ....	16

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

---