

Sandra Mohr  
Dr. med.

## **Die funktionelle Rolle des *Serotonin Reuptake Transporters* im humanen Gastrointestinaltrakt und mögliche Zusammenhänge mit dem Reizdarmsyndrom**

Fach/Einrichtung: Humangenetik  
Doktormutter: Frau PD Dr. rer. nat. Beate Niesler

Das Reizdarmsyndrom (RDS) ist eine funktionelle Darmerkrankung, die mit abdominellen Schmerzen sowie Diarrhö (RDS-D) bzw. Obstipation (RDS-C) einhergeht. Frauen erkranken in etwa doppelt so häufig am RDS wie Männer. Fehlende morphologische oder biochemische Korrelate erschweren die Diagnosestellung und auch die Therapie gestaltet sich schwierig.

Serotonin kommt physiologisch als Botenstoff im Zentralen Nervensystem und in der Peripherie vor. Es ist in die Regulation der Darmmotilität und Sekretionsvorgänge involviert. Vorgänge die bei RDS-Patienten beeinträchtigt sind. Störungen der Serotonin-Reizübermittlung im Gastrointestinaltrakt sind bei der Entstehung des RDS naheliegend. Ionotrope bzw. metabotrope Rezeptoren vermitteln die Serotonin-Wirkung auf die Peristaltik, Sekretion, Sensibilität und den Muskeltonus. Der gastrointestinale Serotonin-Transporter *SERT* (*Serotonin Reuptake Transporter*) ist ein wichtiger Regulator der verfügbaren Menge an Serotonin im Gastrointestinaltrakt. *SERT* schützt vor sensomotorischer Überstimulation oder Desensibilisierung durch Serotonin, indem er als Transmembranprotein die extrazelluläre Serotonin-Konzentration durch Wiederaufnahme und anschließendes Recycling bzw. durch Abbau mitbestimmt. Der genetische Beitrag von *SERT* am RDS ist in der Vergangenheit bereits ausführlich an verschiedenen tierischen Spezies untersucht worden. Die Ergebnisse sind bis heute widersprüchlich. Veränderungen im *SERT* kodierenden Gen *SLC6A4* (*Large Solute Carrier Transporter*) führen zu einer gestörten *SERT*-Expression, -Regulation und -Funktion. Untersuchungen am Menschen haben in den letzten Jahren an Zahl zugenommen. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind an humanen Proben durchgeführt worden.

Die Expression von *SLC6A4* unterliegt einer komplexen transkriptionellen Regulation, welche durch Polymorphismen beeinflusst wird. Der *5-HTTLPR*- (*Serotonin Transporter Gene-Linked Polymorphic Region*) und der *STin2*- (*Serotonin Transporter Intron 2*) Polymorphismus wurden in diesem Zusammenhang in der Literatur intensiv diskutiert. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation ist im Zusammenhang mit dem RDS nicht eindeutig möglich gewesen. Eine Erklärung für die widersprüchliche Datenlage könnte die Existenz eines alternativen Promotors P2, der die Genexpression überwiegend im Gastrointestinaltrakt antreibt, liefern. Polymorphismen in dieser Region könnten verantwortlich für eine unterschiedliche Regulation gastrointestinaler und hirnspezifischer *SERT* sein und eine überaus wichtige Rolle bei gastrointestinalen Fehlfunktionen einnehmen.

Um einen Zusammenhang zwischen möglichen Promotor-2-Varianten und dem Auftreten von RDS zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit eine Mutationsanalyse des alternativen *SERT*-Promotors durchgeführt. Dabei konnten insgesamt zwölf Sequenzvarianten nachgewiesen werden. Bei allen Varianten handelte es sich um Einzelnukleotid-Polymorphismen. Diese *SNPs* (*Single Nucleotide Polymorphisms*) könnten einen Einfluss auf die Aktivität des Promotors haben. In einer Assoziationsanalyse zeigten sechs dieser *SNPs* eine Assoziation bei weiblichen RDS-C Patienten. Bemerkenswerterweise bildeten die *SNPs* zusammen einen Haplotypenblock und lagen im Kopplungsungleichgewicht. Ein *SNP*

wurde für weitere Analysen als Tag-*SNP* ausgesucht. Alle anderen *SNPs* konnten von diesem Tag-*SNP* abgeleitet werden. Die Genotypenfrequenz dieses *SNPs* wurde in einem weiteren Kollektiv auf Zusammenhänge zwischen einer Variante und dem Geschlecht des Trägers der Variante untersucht. Auch diese Studie bestätigte die Vermutung, dass das Risikogen in der Gruppe der weiblichen RDS-C-Patienten zu finden ist.

Um zu überprüfen, ob die Haplotypen möglicherweise eine regulative Funktion auf die Promotoraktivität des alternativen *SERT*-Promotors P2 ausüben, wurde der Promotor jeweils mit dem aus der Assoziationsanalyse abgeleiteten Protektiv- und Risikohaplotyp in einer Genreporteranalyse untersucht. Die Haplotypvarianten führten zu einer unterschiedlichen *SERT*-Expression: Der Risikohaplotyp führte zu einer höheren *SERT*-Expression als der Protektivhaplotyp. Eine funktionelle Auswirkung der Variante auf die *SERT*-Expression und deren Rolle in der Modulation des serotonergen Systems erscheint naheliegend. Die Assoziationsanalyse und die sich anschließende funktionelle Charakterisierung zeigten einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Risikohaplotypen und RDS-C. Der Effekt war besonders bei Frauen deutlich geworden. Somit bestätigt diese Arbeit aufs Neue, wie wichtig der Faktor Geschlecht bei der Pathophysiologie des RDS sein muss.

Darüber hinaus wurde mit der Fragestellung, welcher Promotor in unterschiedlichen Organen die Expression antreibt, die Existenz möglicher gewebespezifischer alternativer *SERT*-Transkripte in vergleichenden Expressionsanalysen untersucht. Einige in der Literatur beschriebene Studien sprechen dafür, dass Exon 1a bevorzugt im Gehirn und Exon 1c bevorzugt im Darm exprimiert wird. Da diese Transkripte durch zwei verschiedene Promotoren reguliert werden, erscheint es denkbar, dass die *SERT*-Transkription in den Enterozyten des Gastrointestinaltrakts unterschiedlich von zentralen Neuronen reguliert wird. In Immunfluoreszenz-Experimenten konnte die in der Literatur bereits beschriebene gastrointestinale *SERT*-Expression in den Enterozyten und in enterischen Neuronen bestätigt werden. Die *SERT*-Expression scheint außerdem in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts nicht einheitlich zu sein. *SERT* konnte außer im Enterischen Nervensystem auch in der Darmmukosa von Duodenum, Ileum und Jejunum nachgewiesen werden. Im Kolon und im Magen wurde kein *SERT* gefunden. Das Duodenum scheint aufgrund der prominenten Expression von *SERT* eine wichtige Funktion bei der Pathogenese des RDS zu haben. Somit konnten in dieser Arbeit nicht nur unterschiedliche gewebespezifische *mRNA*-Spleißvarianten, sondern auch eine unterschiedliche Verteilung des *SERT*-Proteins im Gastrointestinaltrakt gezeigt werden.

Darüber hinaus wurde der Nachweis von *SERT* auf RT-PCR-, Western Blot- und Immunfluoreszenz-Ebene etabliert und steht für systematische Folgeanalysen zur Verfügung.

Schlussfolgernd konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden, dass es genetische Einflüsse gibt, die auf das RDS einwirken. *SERT* stellt in diesem Zusammenhang einen interessanten Kandidaten dar. Bei multifaktoriellen Erkrankungen, wie dem RDS, führt jedoch erst das komplexe Zusammenspiel von Gen- und Umweltfaktoren zur Krankheitsentstehung. Allein eine umfangreiche Analyse aller Zusammenhänge, die einen Einfluss auf das RDS ausüben, kann zur Erforschung des RDS führen. Weitere Studien, die die transkriptionelle Regulation von *SERT* und das genaue Bild des *SERT*-Expressionsmusters klären, sind von großem Interesse. Außerdem wäre es interessant, Interaktionen zwischen verschiedenen Kandidatengenen des RDS zu untersuchen und diese im Zusammenhang mit psychiatrischen und extraintestinalen Symptomen zu beobachten. Systematische Analysen genetischer Faktoren und deren Korrelation mit phänotypischen Merkmalen könnten die Grundlage zur Erforschung der RDS-Pathophysiologie bilden.