

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Herr Prof. Dr. med. W. Mutschler

**Bildung pro- und antiinflammatorischer
Zytokine in Monozyten
von Morbus Crohn Patienten
in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15
Genotyp**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Anja Mair
aus Bobingen
2007

Mit Genehmigung der Medizinische Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. Folwaczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr. G. Enders
Priv. Doz. Dr. J. Schirra

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. H.P. Török

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2007

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

- Monozytäre Zytokinproduktion bei M. Crohn Patienten in Abhängigkeit vom

NOD2/CARD15-Genotyp

Török HP, Glas J, Schaaf A, Mussack T, Ochsenkühn T, Schnitzler F, Lohse P, Folwaczny C

Z Gastroenterol 2003;41:733–880 (*Abstract-Band zur 58. Tagung der Dt. Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten*)

- In patients with Crohns disease the 3020insC mutation of the NOD2/CARD15 gene results in impaired monocytic TNF α and enhanced IL10 synthesis

Török HP, Glas J, Schaaf A, Friedrich N, May E, Folwaczny C

Gastroenterology 2003;124:A333

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Morbus Crohn	9
1.2	Genetische Disposition	16
1.2.1	Das NOD2/CARD15-Gen	16
1.2.2	Mutationen im CARD15-Gen	21
1.2.3	Muramyldipeptid	24
1.3	Zielsetzung	25
2	Material und Methoden	27
2.1	Studienpopulation	27
2.1.1	LPS-Stimulation: Teil 1	28
2.1.2	MDP- und LPS-Stimulation: Teil 2	29
2.2	Material	30
2.2.1	Chemikalien und Lösungsmittel für die Zellisolation	30
2.2.2	kommerzielle Komplettsysteme	30
2.2.3	Medien und Medienzusätze zur Kultivierung und Stimulation	31
2.2.4	Antikörper für die FACS-Analyse	31
2.2.5	Geräte	32
2.2.6	Sonstiges	33
2.3	Methoden	33
2.3.1	Probengewinnung	33

2.3.2	Monozytenisolation	33
2.3.3	FACS-Analyse	38
2.3.4	Zellkultur und Stimulation mit LPS bzw. MDP	39
2.3.5	Zytokinmessungen	39
2.3.6	Genotypisierung	41
2.3.7	mRNA-Expression	41
2.3.8	Statistik	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Methodenauswahl zur Monozytenisolation	43
3.2	Erstellung einer Zeitkurve	44
3.3	LPS-Stimulation: Teil 1	44
3.3.1	TNF α -Sekretion	46
3.3.2	IL10-Sekretion	48
3.4	MDP- und LPS-Stimulation: Teil 2	50
3.4.1	TNF α -Sekretion	50
3.4.2	IL10-Sekretion	56
4	Diskussion	61
4.1	Mögliche systematische Fehler	61
4.1.1	Vorstimulation der Zellen	61
4.1.2	Isolationsmethode	62
4.2	Bewertung der Ergebnisse	62
4.2.1	Monozytäre Zytokinproduktion in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp nach LPS-Stimulation	62
4.2.2	Monozytäre Zytokinproduktion in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp nach MDP-Stimulation	63
4.2.3	Vergleich mit mRNA-Daten	65
4.2.4	Vergleich mit anderen Literaturdaten	66
4.3	Mögliche pathogenetische Erklärungsansätze	68

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	7
5 Zusammenfassung	73
A Abkürzungen	77
Literaturverzeichnis	79
Lebenslauf	95
Danksagung	97

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Morbus Crohn

Morbus Crohn gehört neben Colitis ulcerosa und der kollagenen sowie lymphozytären Colitis zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit chronisch rezidivierendem, in Schüben auftretendem Verlauf. Es handelt sich um eine Erkrankung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann, mit diskontinuierlich segmental auftretender granulomatöser Entzündung auch der tiefen Wand-schichten mit häufigster Lokalisation im terminalen Ileum (Ileitis terminalis) und proximalen Kolon [Pod02].

Epidemiologie Die Häufigkeit von M. Crohn ist in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts vor allem in den westlichen Industrienationen deutlich angestiegen und hat sich in den letzten Jahren dort auf einem hohen Level stabilisiert. So liegt die Inzidenzrate in Nordamerika derzeit bei 3,1–14,6 pro 100000 Personen, die Prävalenz bei 26–199 pro 100000 Personen [Ber99, Lof04]. In Europa beträgt die Inzidenzrate 0,7–9,8 pro 100000 Personen und die Prävalenz 8,3–214 pro 100000 Personen [Lof04]. Dabei ist ein West–Ost–Gefälle mit deutlich niedrigeren Prävalenzen und Inzidenzen in Asien und Ozeanien zu beobachten, wie zum Beispiel in Japan eine Inzidenz von 0.5 pro 100000 Personen pro Jahr

[Lof04]. Allerdings wurden in den letzten Jahren, möglicherweise bedingt durch den westlichen Lebens- und Ernährungsstil, auch dort ansteigende Zahlen registriert [Kar00, Yan01]. Außerdem konnte ein Nord–Süd–Gefälle sowohl innerhalb von Nordamerika als auch in Europa in der Häufigkeit von M. Crohn mit der höchsten Prävalenz für Europa in Großbritannien und Skandinavien festgestellt werden [Shi96]. Bezüglich der Geschlechterverteilung sind Frauen in den meisten Studien etwas häufiger von M. Crohn betroffen [Kar00]. Das Erkrankungsalter bei Diagnose liegt zwischen 33 und 45 Jahren und einem zweiten schmäleren Gipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr [Lof02].

Ätiologie und Pathogenese Die Ätiologie von M. Crohn ist weitgehend unbekannt, allerdings scheint eine multifaktorielle Genese vorzuliegen.

Zum einen werden Umweltfaktoren wie Rauchen [Hug99, Lin88, Sil89], Appendektomie [And03], persistierende Virusinfektionen oder eine Infektion mit Paratuberkulosebakterien [Bul03, Fio98], die zu einer veränderten mukosalen Barrierefunktion führen, und Trigger wie Antibiotika und Diät, die zu einer veränderten luminalen Bakterienflora führen, diskutiert. Auch gibt es Daten einer Assoziation von M. Crohn mit einem besseren häuslichen Hygienestandard in der Kindheit [Gen94, Kou96] und Daten, die ein niedrigeres Risiko zur Entwicklung von M. Crohn unter ärmeren Lebensbedingungen beschreiben [Kar00, McC01].

Zum anderen gibt es deutliche Hinweise auf eine Störung der Immunregulation auf dem Boden einer genetischen Disposition. So wurde in Studien ein ethnisch gehäuftes Auftreten, eine Häufung innerhalb von Familien mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und eine höhere Prävalenz bei monozygoten im Vergleich zu dizygoten Zwillingen beobachtet. Als Beispiel für ethnische Unterschiede sei hier eine 2–4fach höhere Inzidenz und eine 2–9fach höhere Prävalenz chronisch entzündlicher Darmerkrankungen bei Kaukasiern jüdischer Herkunft im Vergleich zu Kaukasiern nicht–jüdischer Herkunft in den USA genannt [Bon03b, Rot89, Yan01]. In Familienstudien wurde gezeigt, dass 5–10% aller be-

troffenen Personen eine positive Familienanamnese aufweisen [Bon03b, Bin98] und dass ein 14–15fach erhöhtes Risiko für erstgradige Familienangehörige, an M. Crohn zu erkranken, besteht [Bon03b, Orh91, Pee96]. In Zwillingsstudien wurden bei monozygoten Zwillingen wesentlich höhere Konkordanzraten im Vergleich zu dizygoten Zwillingen, die nicht signifikant unterschiedlich zu anderen Geschwistern waren, beschrieben. So betragen die Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen 42–58%, während sie bei dizygoten Zwillingen nur bei 7% liegen [Bon03b, Bin98, Tho96, Tys88].

Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass eine genetisch bedingte Störung der immunologischen Antwort des angeborenen Immunsystems gegenüber luminalen Antigenen im Darm besteht, was pathophysiologisch zur Aktivierung immunkompetenter Zellen der Darmwand und anschließender überschießender, vor allem Th1-Zell-vermittelter Reaktion mit Ausschüttung der spezifischen Entzündungsmediatoren Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) und Interferon γ (IFN γ) führt. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Makrophagen mit verstärkter Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine (Interleukine: IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL12). Das schließlich bedingt eine chronisch transmurale Entzündung der Darmwand mit Ausbildung lokaler Gewebsschädigungen wie Erosionen, Nekrosen und Ulzerationen.

Diese Beobachtungen indizieren, dass genetische und Umgebungseinflüsse starke unabhängige, aber synergistische Variablen bei der Entstehung von M. Crohn sind, die die Interaktion von genetischer Empfindlichkeit, Umwelttriggern und die konstante antigene Stimulation von luminalen Darmbakterien erfordert (Abb. 1.1).

Klinik Das Leitsymptom bei M. Crohn sind flüssige bis wässrige Diarrhöen, die häufig von krampfartigen Abdominalschmerzen, besonders im rechten Unterbauch („Pseudoappendizitis“), begleitet werden. Blut- oder Schleimbeimengungen kommen im Gegensatz zu Colitis ulcerosa selten vor. Unspezifische Sympto-

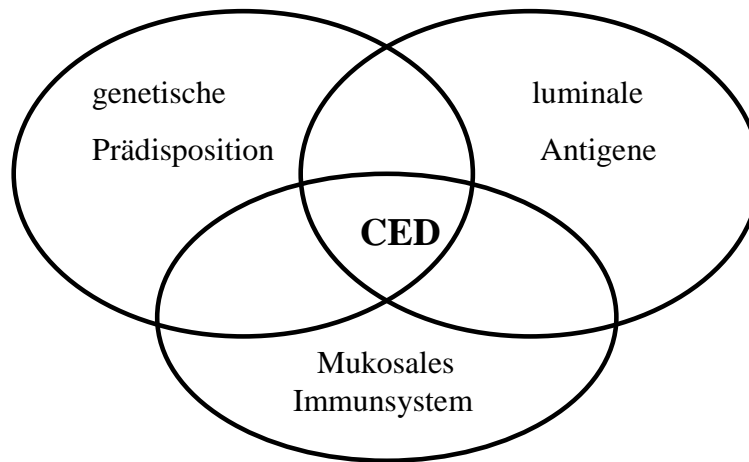


Abb. 1.1: Modell zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED): Interaktionen zwischen genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren wie Stimulation durch luminale bakterielle Antigene im Darm aktivieren das mukosale Immunsystem und bewirken eine chronisch entzündliche Reaktion

me wie Übelkeit, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit und Gewichtsverlust können vorhanden sein. Die Erkrankung verläuft meist schubweise mit Fieber, Leukozytose und Anämie.

Diagnostik Die Diagnostik bei Verdacht auf eine Crohn-Erkrankung beinhaltet eine gründliche Anamnese und klinische Untersuchung. Danach kommt vor allem eine Kolo-Ileoskopie mit Biopsien zum Einsatz. Makroskopisch zeigt sich dabei eine transmurale Entzündung mit segmentaler Ausdehnung und fibrotischen Wandverdickungen mit verengtem Darmlumen sowie lineare Schleimhautulzerationen und eine Hyperplasie der zugehörigen Lymphknoten (70% der Fälle). Neben den befallenen Darmabschnitten finden sich normale Darmsegmente, die prästenotisch dilatiert sein können. Histologisch lassen sich ein entzündliches Infiltrat aus Makrophagen und Lymphozyten sowie in 40% der Fälle epitheloidzellige riesenzellhaltige Granulome nachweisen. Desweiteren werden bildgebende Verfahren wie röntgenmorphologische Untersuchungen, vor allem das

Sellinck-MRT (segmentaler diskontinuierlicher Befall: „skipplesions“, Pflastersteinrelief, fadenförmige Stenosen) und Sonographie (Wandverdickungen, Abszesse, Fisteln, Lymphknoten) angewendet. Zu den mikrobiologischen Untersuchungen gehört immer eine bakteriologische Stuhldiagnostik zum Ausschluss einer infektiösen Darmerkrankung und bakteriellen oder viralen Superinfektionen im akuten Schub. Laborparameter wie BSG-Beschleunigung, Leukozytose und erniedrigtes Albumin kennzeichnen einen akuten Schub, eine hypochrome Anämie weist auf einen chronischen intestinalen Eisenverlust hin. Nach der Primärdiagnostik muss eine Suche nach weiteren Manifestationsorten im gesamten Gastrointestinaltrakt und nach extraintestinalen Manifestationen erfolgen.

Komplikationen Als intestinale Komplikation kann ein Malabsorptionssyndrom mit Gewichtsverlust, megaloblastärer Anämie durch Vitamin B12-Mangel und chologener Diarrhoe durch Gallensäure-Verlustsyndrom vorkommen. Daneben können die entzündlichen Stenosen der Darmabschnitte zu einem Ileus führen. Typisch ist außerdem die Ausbildung von inneren und äußeren Fisteln (40–50%) und anorektalen Abszessen (25%). Selten — erst nach längerem Krankheitsverlauf — ist eine maligne Entartung (Karzinome des Dünndarms, kolorektale Karzinome) zu beobachten [Sol98].

Bei extraintestinalen Manifestationen sind Ätiologie und Pathogenese ähnlich der Grundkrankheit letztlich ungeklärt. Sie treten oft parallel zum Ausmaß und der Aktivität der Erkrankung auf. In Tabelle 1 sind die wichtigsten systemischen Krankheitserscheinungen aufgeführt.

Verlauf Der Krankheitsverlauf ist individuell sehr unterschiedlich. Bei 20% der Patienten kommt es zu einem kontinuierlichen Verlauf mit ständig vorhandener Entzündungsaktivität, bei 35% zu einem intermittierend aktiven und bei 45% zu einem klinisch inaktiven Verlauf (5–10 Jahre nach Erstdiagnose)[Lin85a]. Bei etwa 30% befällt der M. Crohn nur das terminale Ileum, in 50% Ileum und Kolon

Organsystem	extraintestinale Manifestation
Ernährung und Stoffwechsel	Gewichtsverlust, Wachstumsretardierung Elektrolytmangel (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}) Hypoalbuminämie (enterales Eiweißverlustsyndrom) Anämie (Eisen-, Folsäure- Vitamin B12-Mangel) Gallensäureverlust-Syndrom
Augen	Iridozyklitis, Uveitis, Episkleritis
Haut und Schleimhäute	Erythema nodosum Pyoderma gangraenosum aphthöse Stomatitis nahrungsbedingte Dermatosen, z.B. Zinkmangeldermatose
Muskulatur und Skelettsystem	Osteoporose, Osteopenie Monarthrit, selten Polyarthrit ankylosierende Spondylitis (meist HLA B27 positiv), Sakroileitis granulomatöse Myositis
Hepatobiliäre Erkrankungen	primär sklerosierende Cholangitis (PSC) Cholelithiasis (Gallensäure-Verlustsyndrom) Pericholangitis Leberzirrhose
Nieren	Oxalat-Nierensteine (Gallensäure-Verlustsyndrom) Amyloidose
Blut	autoimmunhämolytische Anämie Venenthrombose, Thromboembolie
Herz	Perimyokarditis
Lunge	fibrosierende Alveolitis

Tabelle 1.1: systemische Krankheitserscheinungen bei M. Crohn

und in 20% nur das Kolon. Das Rektum ist bei Kolonbeteiligung nur in 5% der Fälle erkrankt [Lin85b, MLP99]. Eine Ausheilung ist sehr selten. Vielmehr kommt es bei 30% nach einem Jahr und bei 40% nach zwei Jahren zu einem klinischen Rezidiv und nach einer Operation ohne sichtbare Läsionen bei 75% nach einem Jahr zu einem endoskopischen Rezidiv [Adl96]. Mit der Vienna-Klassifikation von 1998 wurde eine Einteilung in 24 Untergruppen vorgenommen, die objektive Variablen wie Alter bei Diagnose, Lokalisation und klinischen Phänotyp berücksichtigt [Gas98].

Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes, der Krankheitsaktivität und des Therapieerfolges eignen sich Aktivitätsindices, die sich aus klinischen Faktoren wie Stuhlfrequenz, Grad der abdominellen Schmerzen und Allgemeinbefinden und laborchemischen Parametern zusammensetzen, wie z.B. CDAI nach Best (Crohn's Disease Activity Index), USA oder SAI (Severity Activity Index), Europa.

Therapie Durch die medikamentöse Therapie von M. Crohn wird versucht, über eine Verringerung der Krankheitsaktivität eine Verbesserung der klinischen Symptomatik sowie eine Steigerung der Lebensqualität des Patienten zu erreichen. Nach Erreichen einer Remission hat die Behandlung das Ziel, das Auftreten von rezidivierenden Schüben zu verhindern. Bei schwerem Krankheitsverlauf (CDAI > 300) kann eine Ruhigstellung des Darmes durch parenterale Ernährung erfolgen. Dazu erfolgt eine systemische Applikation von Kortikosteroiden (40–60mg/d Prednison) und gegebenenfalls auch der Einsatz von Antibiotika. Bei mittelschwerem Verlauf (CDAI < 300) empfiehlt sich ein Therapieschema der Amerikanischen und Europäischen Crohn-Studie, die differenziert nach Befall des Gastrointestinaltraktes vorgeht. Dabei kommen vor allem unspezifische entzündungshemmende Substanzen wie Glukokortikoide und Aminosalicylate zum Einsatz. Im Allgemeinen wird die Therapie nach 3 bis 6 Monaten beendet, wenn es zu einer Normalisierung des Aktivitätsindex gekommen ist. Bei Nichtansprechen und mehr als zwei kortisonpflichtigen Schüben pro Jahr

gelten Immunsuppressiva wie Azathioprin/6-Mercaptopurin als Mittel der Wahl. Patienten mit Fistel erhalten zusätzlich Metronidazol. Bei chronischem Verlauf ist eine langfristige Medikation mit Azathioprin oder neuerdings auch mit TNF α -Antikörpern bei Nichtansprechen auf Steroide und Azathioprin oder therapieresistenten Fisteln erforderlich. Zur Remissionserhaltung und bei chronisch aktivem Verlauf empfiehlt sich die Gabe von Purinanaloga wie Azathioprin.

Die Indikation zur operativen Versorgung wird sehr eng gestellt, da postoperative Rezidive in 30–50% der Fälle zu beobachten sind und die Entstehung eines Kurzdarm-Syndroms zu vermeiden ist. Eine Operation erfolgt nur bei akuten Komplikationen (Perforation, Blutung, Ileus), bei rezidivierenden Fisteln und Abszessen. Allerdings ist dies bei etwa 55% der Patienten nach einer Krankheitsdauer von 10 Jahren nötig [Lin85b].

1.2 Genetische Disposition

Wie schon im vorigen Abschnitt erwähnt und in zahlreichen Studien belegt, spielt in der Ätiopathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen, vor allem bei M. Crohn, die genetische Disposition und neben diesem Hintergrund die bakterielle Darmflora eine große Rolle [Orh91, Tho96, Tys88]. Das ideale „Crohn-Gen“ wäre damit ein Gen, das die Empfindlichkeit des mukosalen Immunsystems gegenüber bakteriellen Stimuli beeinflusst. Der Vererbungsmodus weist jedoch auf eine polygen bedingte Erkrankung hin.

1.2.1 Das NOD2/CARD15-Gen

In den letzten Jahren wurden zahlreiche positionelle und funktionelle Kandidatengene für M. Crohn untersucht, aber erst 2001 konnten drei Arbeitsgruppen das erste deutlich mit M. Crohn assoziierte Gen NOD2/CARD15 (Nucleotide-binding Oligomerisation Domain 2/Caspase Activation and Recruitment Domain 15) identifizieren [Ham01, Hug01, Ogu01a]. Das NOD2/CARD15-Gen liegt in

der perizentromerischen Region des Chromosom 16 innerhalb des IBD1 Locus (Inflammatory Bowel Disease susceptibility Locus 1) [Hug96], was in mehreren unabhängigen Studien [Ann99, Bra98, Cur98] und vom Internationalen IBD Consortium als Suszeptibilitätslocus für den M. Crohn [Cav01] bestätigt wurde. Der IBD1 Locus stellt die Kopplungsregion mit dem höchsten LOD-Score (logarithm of odds-score) für M. Crohn dar [Cav01, Hug96]. Der LOD-Score wird in der Genetik als statistische Abschätzung der Wahrscheinlichkeit herangezogen, ob zwei Loci (Genorte) auf demselben Chromosom nah beieinander liegen und somit gekoppelt vererbt werden. Ein LOD-Score größer drei wird üblicherweise als Indikator für eine Genkopplung angesehen.

Im Folgenden wird das Gen immer als CARD15 bezeichnet, das Protein als NOD2.

Struktur und Funktion von NOD2/CARD15

Struktur NOD2 gehört zur Familie der NOD1/Apaf1 (Apoptotic protease-activating factor 1)-Proteine [Ino01b]. Hierbei handelt es sich um intrazelluläre Proteine, die durch drei Domänen charakterisiert sind: eine N-terminale CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain), eine zentral liegende NBD (Nucleotide Binding Domain), und eine C-terminale regulatorische Domäne [Bet99, Ino99]. Während Apaf1 C-terminal WD40-Wiederholungen enthält, besitzen NOD1 und NOD2 dort eine leucinreiche Region (Abb. 1.2) [Bet99, Ino99]. Diese Region ist für die Erkennung bakterieller Bestandteile verantwortlich [Gir02, Ino01a]. Die NBD vermittelt die Aktivierung von nachgeschalteten Effektormolekülen durch Selbstoligomerisation und induzierte Nähe und die N-terminale CARD-Region vermittelt die Bindung an die Effektormoleküle (z.B. Procaspase 9 und RICK), was zu einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege führt [Bet99, Ino99]. NOD2 enthält im Gegensatz zu NOD1 zwei CARD-Domänen [Ogu01b]. Die C-terminale leucinreiche Region ähnelt der von Proteinen, die Pflanzen gegenüber Infektionen resistent machen [Ino99, Ino01a, Ogu01b].

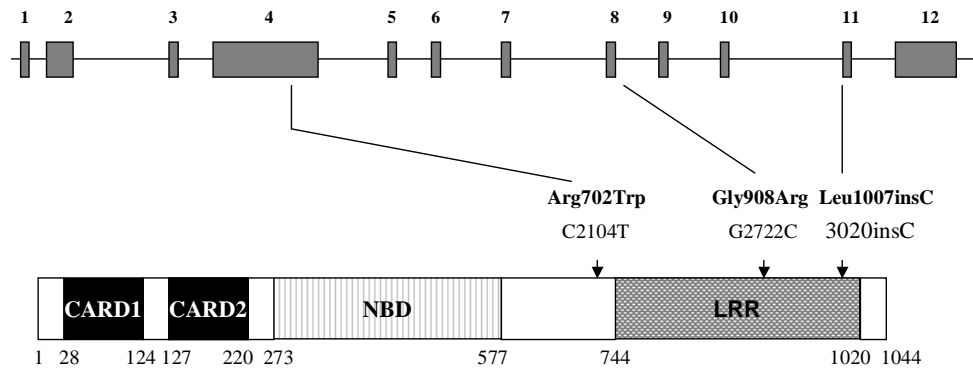


Abb. 1.2: Intron/Exon-Struktur des CARD15-Gens und Struktur des NOD2-Proteins: funktionelle Domänen und Mutationen. CARD — Caspase Activating and Recruitment Domain; NBD — Nucleotide Binding Domain; LRR — Leucin-Rich Repeats. Modifiziert nach [Hug01, Ogu01a].

Anfangsbeobachtungen zeigten, dass NOD2 im Gegensatz zu NOD1 und Apaf1, die ubiquitär vorhanden sind, hauptsächlich in Monozyten exprimiert wird [Ogu01b]. Neuere Studien haben eine Basisexpression von NOD2 in Granulozyten, dendritischen Zellen [Gut02] und vor allem intestinalen Epithelzellen [His03] nachgewiesen. Es wurden erhöhte Expressionsraten an NOD2 in Epithelzellen der Darmmukosa [Brr03, Ros03], vor allem in Panethzellen [Lal03] bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen gefunden. Die Expression kann durch proinflammatorische Zytokine und eine Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen via Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-Aktivierung induziert werden [Gut02, Ros03].

Funktion Dem NOD2-Protein kommt eine Rolle in der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen mit nachfolgender Aktivierung des NF- κ B-Systems zu, ein gewisser Zusammenhang mit der Apoptose wird vermutet, ist aber noch nicht bewiesen.

In seiner Funktion ähnelt das NOD2-Protein den *membranständigen* Toll-like Rezeptoren (TLR), die für die Erkennung bakterieller Antigene und nachfolgen-

der inflammatorischer Antwort über NF- κ B-Aktivierung von Bedeutung sind [Tak01]. Somit gehört NOD2 zu den PRRs (Pattern Recognition Receptors) des angeborenen Immunsystems, die die Unterscheidung zwischen mikrobiellen und körpereigenen Molekülen vermitteln [Jan02]. Diese Rezeptoren erkennen spezifische Antigene, sogenannte PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns). Im Gegensatz zu diesen membranständigen Rezeptoren fungiert das NOD2-Protein als intrazellulärer Rezeptor für pathogene Bestandteile, die von Bakterien stammen [Bon03a, Gir02, Ino01a]. Die leucinreiche Region von NOD2 soll für die Erkennung von Muramyldipeptid (MDP), dem kleinsten pathogenen Bestandteil von Peptidoglykan (PGN), verantwortlich sein, allerdings ist über den Mechanismus der Erkennung noch nichts bekannt [Ino03b].

Nach der Erkennung von MDP wird das NF- κ B-System aktiviert, was durch eine NOD2/CARD15-Oligomerisation und nachfolgender CARD-CARD-Interaktion zwischen der NOD2-CARD-Region und RICK, einer Serin Threonin Kinase mit C-terminaler CARD-Region, und über IkappaB-Kinasen (IKK) vermittelt wird [Ino99, Ogu01b]. Die NF- κ B-Aktivierung wiederum führt zu einer Expression inflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF α , Adhäsionsmolekülen und MHCII-Molekülen [Ino03a] (siehe Abb. 1.3).

Vor der Identifizierung von MDP als intrazellulärer Stimulus für NOD2 wurde angenommen, dass bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) diese Funktion ausüben. So wurde die NOD2-vermittelte Antwort auf LPS-Präparationen verschiedener Bakterien 2001 von Ogura et al. an mit NOD2 transfizierten embryonalen Nierenepithelzellen (HEK293T) gezeigt [Ogu01b]. Allerdings waren dort die LPS-Präparationen mit PGN, also auch mit dem Stimulus MDP, kontaminiert, so dass diese Annahme der intrazellulären NOD2-Stimulation durch LPS falsch war [Gir03]. LPS ist aber in der Lage, via Lipid A an den membranständigen TLR4 in Verbindung mit CD14 und seinem Korezeptor MyD88 zu binden und so eine NF- κ B-Aktivierung hervorzurufen. In gleicher Weise fungiert TLR2 auch als Rezeptor für Lipoteichonsäuren (LTA) [Jan02, Tak03a, Tak03b].

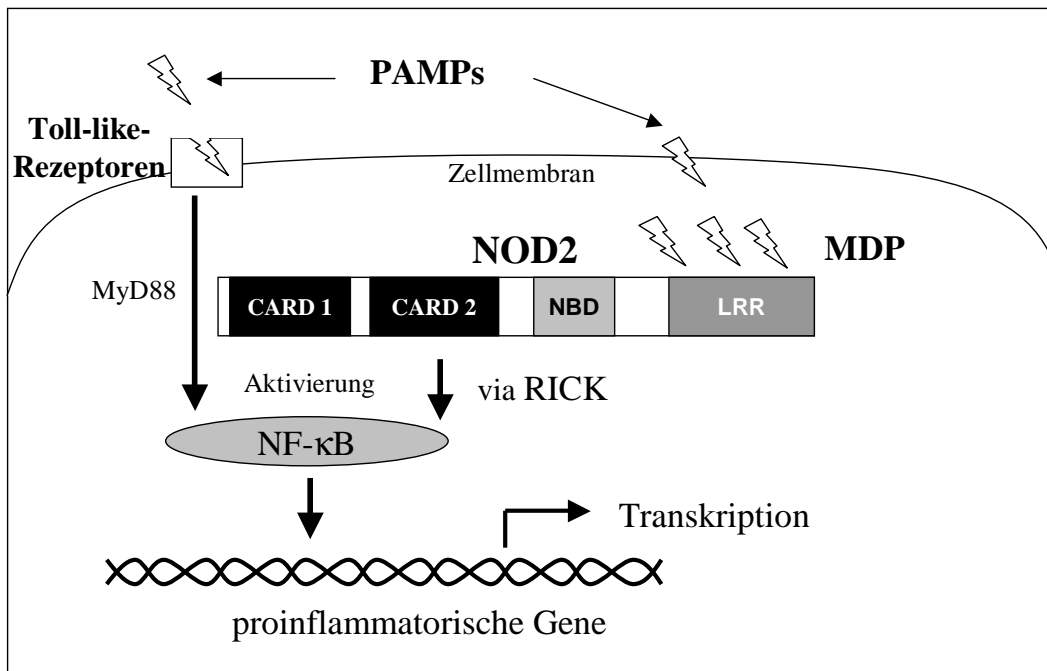


Abb. 1.3: Funktion des NOD2-Proteins als cytosolischer Rezeptor für bakterielle Bestandteile: ähnlich wie die Toll-like Rezeptoren an der Zelloberfläche fungiert NOD2 als Rezeptor für Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs) im Cytosol. Die Erkennung durch die leucinreiche Region von NOD2 führt zur Aktivierung von NF- κ B und nachfolgender Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Modifiziert nach [Ino02].

In der Apoptose spielt das NOD2-Protein vermutlich ebenfalls eine Rolle. So wird über die CARD-Domänen eine Interaktion der Apoptose-Regulatorproteine vermutet. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des NOD2-Proteins nicht selbständig Apoptose induzieren kann, jedoch zur Erhöhung der durch Caspase 9 induzierten Apoptose führt [Ino99]. Die Bedeutung dieser proapoptotischen Aktivität ist bis jetzt noch unklar.

1.2.2 Mutationen im CARD15-Gen

Es wurden drei Single Nucleotid Polymorphismen (SNP) im CARD15-Gen beschrieben, die eine Assoziation mit M. Crohn in europäischen und amerikanischen Populationen aufweisen: eine frameshift Mutation und zwei missense Varianten (siehe Abb. 1.2). Diese drei Hauptmutationen machen 82% der Crohn-assoziierten Mutationen im CARD15-Gen überhaupt aus [Les02], während die restlichen 18% auf 27 seltene Mutationen fallen. Die häufigste der drei Hauptmutationen ist die frameshift Mutation (Leu1007fs), eine Cytosinininsertion im Exon 11 am Nukleotid 3020 (3020insC) [Hug01, Ogu01a]. Die Assoziation der L1007fs-Mutation mit M. Crohn wurde durch andere und unsere Arbeitsgruppe bestätigt [Abr02, Ahm02, Cut02, Ham02, Les02, Mur02, Rad02, Ver02]. Die Mutation wurde in verschiedenen Studien zwischen 7 und 16% bei M. Crohn im Vergleich zu 0–4% bei gesunden Kontrollen beobachtet [Tor03]. Außerdem weist sie eine Assoziation mit klinischen Subtypen wie dem fibrostenotischen und fistulierenden Subtyp und mit einer Ileozökalresektion [Abr02, Ahm02, Cut02, Ham02, Les02, Mur02, Rad02, Ver02] sowie eine negative Assoziation mit dem inflammatorischen Subtyp auf [Rad02]. Die zweite mit M. Crohn assoziierte Mutation ist eine missense Variante im Exon 4 (C2104T), welches einen Aminosäure-Austausch Arg702Trp (R702W) verursacht, die bei 11–13% der M. Crohn Patienten im Gegensatz zu 4–5% bei gesunden Kontrollen vorkommt [Tor03]. Die dritte Mutation ist ebenfalls eine missense Variante im Exon 8 (G2722C), resultierend in dem Aminosäure-Austausch Gly908Arg (G908R). Sie wird bei 2–6% der M. Crohn Patienten und 1–3% der Kontrollen beobachtet [Tor03]. Dabei fällt auf, dass in asiatischen Populationen keine der drei Mutationen sowohl bei M. Crohn Patienten als auch bei Kontrollkollektiven gefunden wurde. In kaukasischen Populationen haben dagegen insgesamt 30–50% der M. Crohn Patienten eine oder mehrere dieser Mutationen im Vergleich zu 15–20% bei gesunden Kontrollen [Les02]. Bezüglich der Hauptmutationen tragen etwa 30% der M. Crohn Patienten ein mutiertes Allel und bis 17%

zwei mutierte Allele im CARD15-Gen [Bon03b]. Patienten mit zwei mutierten Allelen (double-dose-Träger), d.h. Homozygote oder compound-Heterozygote, zeigen einen im Durchschnitt zwei Jahre früheren Beginn der Erkrankung und einen häufigeren ilealen Befall im Vergleich zum Durchschnitt aller M. Crohn Patienten [Ahm02, Les02].

Bedeutung der Mutationen des CARD15-Gens

Durch die Mutationen des CARD15-Gens besteht ein erhöhtes Risiko an M. Crohn zu erkranken. So haben heterozygote Träger ein 2-4fach, double-dose-Träger (homozygote oder compound heterozygote Träger) ein 20-40fach erhöhtes Risiko für M. Crohn [Bon03b, Hug01]. Der Mechanismus, durch welchen die beschriebenen genetischen Varianten des CARD15-Gens zu einer erhöhten Prädisposition für M. Crohn führen, ist bisher unbekannt. Zu der Bedeutung der CARD15-Mutationen wurden in letzter Zeit mehrere Studien in künstlichen Modellen durchgeführt (siehe unten). Die untersuchten Single Nucleotid Polymorphismen im CARD15-Gen befinden sich in der oder in der unmittelbaren Nachbarschaft der C-terminalen leucinreichen Domäne, die für die Erkennung bakterieller Bestandteile verantwortlich ist (siehe Abb. 1.3).

L1007fs Die Cytosinininsertion an der Position 3020 führt zu einer Leseraster-Verschiebung und zu einem frühzeitigen Stopcodon und damit zu einem verkürzten NOD2-Protein. Dieses besteht nur noch aus 1007 Aminosäuren im Vergleich zu 1040 Aminosäuren beim Wildtyp-Protein. Die funktionelle Konsequenz daraus wurde in *in vitro* Studien mit transfizierten embryonalen Nierenzellen (HEK293T) untersucht und es zeigte sich zunächst, dass die NOD2-mutierten Zellen die Fähigkeit zur NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit LPS und PGN im Gegensatz zu den NOD2-Wildtyp Zellen gänzlich verlieren [Ogu01a, Bon03a]. Später stellte sich heraus, dass die LPS-Präparationen mit PGN/MDP kontaminiert waren und diese funktionelle Konsequenz nur für MDP bzw. PGN gilt.

R702W, G908R Die funktionelle Bedeutung der beiden missense Varianten R702W und G908R ist bisher ebenfalls unbekannt. Allerdings wurde auch in *in vitro* Studien an transfizierten Nierenzellen nachgewiesen, dass die R702W- und G908R-mutierten Zellen eine signifikant verringerte NF- κ B-Aktivierung aufweisen [Bon03a] und NOD2 damit ebenfalls in seiner Funktion als Erkennen von bakteriellen Bestandteilen defekt ist.

Diese Erkenntnisse der *in vitro* Studien mit verringerter bzw. fehlender NF- κ B-Aktivierung stehen allerdings im Widerspruch zur *in vivo* Situation bei M. Crohn, die durch eine Überaktivierung des NF- κ B-Systems in entzündeter intestinaler Mukosa und konsekutiv durch eine vermehrte Bildung von proinflammatorischen Zytokinen gekennzeichnet ist [Sch98]. Mögliche Erklärungsansätze für diese Diskrepanz sind:

- die Aktivierung des NF- κ B-Systems durch NOD2 könnte auch durch andere, nicht untersuchte Stimuli erfolgen [McG01];
- eine mögliche Induktion antiinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin 10, durch NOD2, welche durch eine gestörte Funktion von NOD2 bei Mutationen ausfallen würde [Ogu01a];
- eine abnorme Adaptation des Darmlumens gegenüber Bakterien, bedingt durch eine Hyporeaktivität des angeborenen Immunsystems [Fol03]. In diesem Modell wäre NOD2 Teil eines Signaltransduktionsweges, der die intestinale Immunantwort gegenüber Bakterien des Darmlumens steuert. Das mutierte CARD15-Gen würde zu einer gestörten Signalübertragung führen, d.h. zur Unfähigkeit der Kontrolle der luminalen Bakterien, was eine erhöhte Invasion der Bakterien in die Darmschleimhaut zur Folge hätte. Das wiederum führt zu einer abnormen T-Zell-Immunantwort mit chronischer Entzündung und aberranter Zytokinproduktion [Ino02]. Durch die CARD15-Mutationen geht also der durch die NF- κ B-Aktivierung hervorgerufene Schutz des Wirtes gegen Pathogene verloren.

1.2.3 Muramyl-dipeptid

In neueren Studien vom Januar 2003 wurde Muramyl-dipeptid (MDP, MurNAc-L-Ala-D-isoGln), der kleinste pathogene Bestandteil von bakteriellem Peptidoglykan, der für biologische Effekte benötigt wird, als Stimulus für NOD2 identifiziert [Ino03b].

Peptidoglykan ist ein Zellwandprodukt grampositiver und gramnegativer Bakterien, welches als Induktor der TNF α - und IL1 β -Produktion im Rahmen der unspezifischen angeborenen Immunantwort fungiert [Nau02]. MDP als dessen kleinster pathogener Bestandteil hat zum einen einen synergistischen Effekt mit LPS und PGN oder Lipoteichonsäure A, der CD14-, TLR2- und TLR4-unabhängig abläuft [Wol02], zum anderen wird MDP im Gegensatz zu LPS und PGN spezifisch durch das zytoplasmatische NOD2 und nicht durch membranständige Toll-like Rezeptoren (TLR1, TLR2, TLR4) erkannt [Ino03b]. Auf die Erkennung durch NOD2 folgt die Aktivierung des NF- κ B-Systems [Gir03, Ino03b]. Auch hier wurde beobachtet, dass mit allen drei mutierte Varianten transfizierte Nierenzellen im Gegensatz zu Wildtyp NOD2-Zellen eine verringerte Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit MDP zeigen [Gir03, Ino03b]. In der Studie von Inohara [Ino03b] wurde außerdem noch festgestellt, dass auch primäre, aus peripherem Blut isolierte mononukleäre Zellen (PBMC) für ihre Antwort auf MDP ein funktionierendes, nicht mutiertes NOD2-Protein benötigen. Im Gegensatz zu Individuen mit Wildtyp oder heterozygotem Genotyp bezüglich der L1007fs-Mutation erfolgte bei homozygoten Trägern der L1007fs-Mutation im CARD15-Gen keine NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation der PBMCs mit MDP. Bezüglich der Auswirkung anderer M. Crohn assoziierter Genotypen gibt es derzeit noch ungenügend funktionellen Studien.

Neben diesen Effekten von MDP auf den NOD2-NF- κ B-Signaltransduktionsweg interessiert noch der Einfluss auf die nachfolgende Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. So wurde kürzlich in einer Studie demon-

striert, dass MDP eine $\text{TNF}\alpha$ -Genexpression ohne signifikante $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in Mono-Mac6-Zellen induziert [Wol02]. Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass in einer menschlichen Vollblut-Kultur die Zugabe von LPS zu MDP eine signifikant erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration im Kulturmedium zur Folge hat, während die Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL10 nicht beeinflusst wurde [Wan00].

1.3 Zielsetzung

Da in der Pathogenese von M. Crohn die genetische Disposition eine große Rolle spielt, beschäftigt sich diese Arbeit mit den Auswirkungen von mit M. Crohn assoziierten Mutationen des CARD15-Gens auf die monozytäre Funktion von erkrankten und gesunden Probanden. Diese sollten auf Proteinebene durch Messung der Zytokinproduktion untersucht werden, während in Vorarbeiten meist auf mRNA-Ebene gearbeitet wurde oder die Untersuchungen auf Ebene der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung stoppten und der „downstream“-Effekt, d.h. die Zytokinproduktion, nicht dargestellt wurde. Dies ist aber von außerordentlicher Wichtigkeit, da die Ausschüttung von Zytokinen auf mehreren Stufen streng kontrolliert wird und verschiedenen negativen Feedbackmechanismen unterworfen ist. Auch die in Vorarbeiten unterschiedlich erzielten Ergebnisse (siehe oben) bedürften einer genaueren Untersuchung bzw. Klärung.

Die Experimente, die bisher über die funktionelle Bedeutung der CARD15-Mutationen durchgeführt wurden, fanden meist in künstlichen Systemen statt, in welchen Zellen mit verschiedenen Varianten des CARD15-Gens transfiziert wurden. In diesen Modellen sind jedoch eine Überexpression der NOD2-Proteine und andere Artefakte der Kultursysteme die Regel, was zu veränderten Ergebnissen führen können. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Monozytenfunktion an aus Vollblut isolierten Monozyten von M. Crohn Patienten und Kontrollpersonen mit verschiedenen CARD15-Genotypen untersucht. Dabei sollte das Verhalten

der Monozyten von M. Crohn Patienten, welche Mutationen des CARD15-Gens tragen, mit dem Verhalten der Monozyten von M. Crohn Patienten, die den Wildtyp im CARD15-Gen besitzen, und von gesunden Kontrollpersonen verglichen werden. Um diesen Vergleich zu verifizieren, wurde die Zytokinproduktion im Zellkulturüberstand nach Isolierung, Kultivierung und Stimulation der Monozyten mit LPS oder MDP gemessen. Dafür eigneten sich $\text{TNF}\alpha$ als proinflammatorisches Zytokin und IL10 als antiinflammatorisches Zytokin. Da zuerst LPS als Stimulus für NOD2 postuliert wurde, sind im ersten Teil dieser experimentellen Arbeit Stimulationen der Monozyten nur mit LPS durchgeführt worden. Da später MDP als spezifischer PAMP für NOD2 identifiziert wurde, wurden anschließend die Untersuchungen mit MDP als Stimulus durchgeführt. Als Vergleich hierzu wurde weiterhin auch LPS verwendet.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

Alle untersuchten Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil, wurden über die Ziele und Inhalte aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung. Die Studie trägt die Ethiknummer 081/05. Die M.Crohn Patienten wurden aus einer Studienpopulation ausgewählt, die in einer Vorarbeit bezüglich der L1007fs-Mutation im NOD2-Gen typisiert worden waren [Rad02] und danach bezüglich der G908R- und R702W-Mutation typisiert wurden. Sie befanden sich in ambulanter oder stationärer Betreuung im Klinikum der Universität München. Bei allen M. Crohn Patienten war die Krankheit zum Zeitpunkt der Untersuchung in Remission und keiner von ihnen hatte in den 6 Monaten vor der Untersuchung eine antiTNF α -Therapie erhalten. Die Kontrollpopulation bestand aus klinisch gesunden, nicht verwandten Mitarbeitern der Klinik, die keine der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen im CARD15-Gen trugen.

2.1.1 LPS-Stimulation: Teil 1

Es wurden vier verschiedene Populationen untersucht:

- eine gesunde Kontrollgruppe (CARD15–Wildtyp)
- M. Crohn Patienten ohne Vorliegen der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen im CARD15–Gen (*Wildtyp*)
- M. Crohn Patienten mit *heterozygotem* Genotyp bezüglich einer der drei Mutationen im CARD15–Gen
- M. Crohn Patienten mit *homozygotem* Genotyp bezüglich der L1007fs–Mutation im CARD15–Gen

	Kontrollen	Morbus Crohn		
		Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
Genotyp	wt/wt	wt/wt	2xL1007fs/wt, 2xR702W/wt, 1xG908R/wt	L1007fs/L1007fs
Anzahl	5	6	5	6
Altersverteilung (a)	28 - 55	34 - 67	26 - 44	28 - 76
Altersdurchschnitt (a)	35,8	44,0	34,2	45,3
Geschlecht (σ / φ)	2 / 3	1 / 5	1 / 4	2 / 4

Tabelle 2.1: Daten der Studienpopulationen: Teil 1

2.1.2 MDP- und LPS-Stimulation: Teil 2

Es wurden fünf verschiedenen Populationen untersucht:

- eine gesunde Kontrollgruppe (CARD15-Wildtyp)
- M. Crohn Patienten ohne Vorliegen der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen im CARD15-Gen (*Wildtyp*)
- M. Crohn Patienten mit *heterozygotem* Genotyp in *einer* der drei assoziierten Mutationen im CARD15-Gen
- M. Crohn Patienten mit mit zwei mutierten CARD15-Allelen (Double-Dose-Mutanten), unterteilt in:
 - M. Crohn Patienten mit *zwei* mutierten CARD15-Allelen, außer L1007fs-Homozygote (*compound Heterozygot*)
 - M. Crohn Patienten mit *homozygotem* Genotyp bezüglich der L1007fs-Mutation im CARD15-Gen

	Kontrollen	Morbus Crohn			
		Wildtyp	Heterozygot	Homozygot	compound Heterozygot
Genotyp	wt/wt	wt/wt	2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt	L1007fs/ L1007fs	L1007fs/G908R, L1007fs/R702W
Anzahl	4	4	4	6	2
Altersverteilung (a)	28 - 55	22 - 68	26 - 44	19 - 76	30 - 40
Altersdurchschnitt (a)	37,5	41,7	35,0	44,3	35,0
Geschlecht (σ / φ)	1 / 3	2 / 2	1 / 3	4 / 2	1 / 1

Tabelle 2.2: Daten der Studienpopulationen: Teil 2

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien und Lösungsmittel für die Zellisolation

Bezeichnung	Quelle
Aqua dest	Braun, Melsungen, Deutschland
autologes humanes Serum 10%	SIGMA, Steinheim, Deutschland
BSA (Albumin, bovine fraction V solution 30%)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
EDTA Titriplex®III	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Erythrozytenlysepuffer	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU München, D
FCS (fetales Kälberserum)	ATTC, Manassas, USA
Ficoll-Paque™Plus	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
PBS-Puffer	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU München, D
Percoll™(density 1,130 g/ml)	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Trypanblau-Lösung 0,4%	SIGMA, Steinheim, Deutschland

Tabelle 2.3: Chemikalien und Lösungsmittel für die Zellisolation

2.2.2 kommerzielle Komplettsysteme

Bezeichnung	Quelle
MACS monocyte isolation kit	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
TNF α ELISA	BioSource Europe, Nivelles, Belgien
IL10 ELISA	BioSource Europe, Nivelles, Belgien

Tabelle 2.4: kommerzielle Komplettsysteme

2.2.3 Medien und Medienzusätze zur Kultivierung und Stimulation

Bezeichnung	Quelle
autologes humanes AB-Serum 10%	SIGMA, Taufkirchen, Deutschland
HEPES-Puffer	ATTC, Manassas, USA
L-Glutamin	ATTC, Manassas, USA
Lipopolysaccharide (LPS) von E.coli 055:B5	SIGMA, Taufkirchen, Deutschland
Muramyl Dipeptid (MDP, Ac-muramyl-Ala-D-Glu-NH ₂)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Penicillin 10000 U/ml	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
RMPI-1640 Medium Vitacell	ATTC, Manassas, USA
Streptomycin 10000 µg/ml	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien

Tabelle 2.5: Medien und Medienzusätze zur Kultivierung und Stimulation

2.2.4 Antikörper für die FACS-Analyse

Bezeichnung	Quelle
anti-human CD3-APC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
anti-human CD14-FITC	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA
FITC mouse IgG, κ	BD Biosciences PharMingen, San Diego, USA

Tabelle 2.6: Antikörper für die FACS-Analyse

2.2.5 Geräte

Bezeichnung	Quelle
Absaugpumpe	Watson Marlow, Falmouth Cornwall, England
Brutschrank Function line	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Synelisa 5.0	Pharmacia & Upjohn Diagnostics, Freiburg, Deutschland
FACScan	labX, Midland, Kanada
Gefrierschrank -20°C	BOSCH, Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank +5°C	AEG, Frankfurt, Deutschland
Laminar Air Flow HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus, Japan
Midi MACS-Magneten	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
MACS Stand multi	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia, USA
horizontaler Schüttler	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge groß (Rotixa/KS)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge klein (Universal 30 RF)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 2.7: Geräte

2.2.6 Sonstiges

Bezeichnung	Quelle
Heparinröhrchen 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Leucosep tubes	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Multipette mit Combitips 2,5 ml	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten und Pipettensitzen	eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pre Separation Filters	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
Transferpette R 30-300 μl	BRAND, Wertheim, Deutschland
48-Well Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 2.8: Sonstiges

2.3 Methoden

2.3.1 Probengewinnung

Nach einer schriftlichen Einverständniserklärung wurde den Probanden zunächst 16–27 ml peripheres Blut mittels Venenpunktion in 2–3 vorgefertigten Röhrchen mit Heparin als Antikoagulant (je 9 ml) abgenommen. Dieser Vorgang geschah zum einen im Rahmen von Kontrolluntersuchungen oder auf gezielte Einbestellung nach einem aufklärenden Telefonat in der gastroenterologischen Ambulanz der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt und der Medizinischen Klinik II Grosshadern, zum anderen bei der Kontrollgruppe unter Mitarbeitern des Labors. Zwischen der Probengewinnung und der Weiterverarbeitung lagen maximal 3 Stunden.

2.3.2 Monozytenisolation

Zur Vermeidung von bakteriellen Kontaminationen wurden sämtliche Arbeitsschritte unter einer Laminar Air Flow unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

1. Anreicherung mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Zentrifugation

Die Verarbeitung des Heparinblutes der Probanden begann mit der Verdünnung von 1:2 mit PBS-Puffer. Anschließend wurden je nach Menge des Materials meist zwei Leucosep-Röhrchen mit horizontalem Filter pro Proband mit 20 ml Ficoll-Paque gefüllt und bei 1000g (2800 U/min) für 30 sec zentrifugiert, um die Ficoll-Lösung unter den Filter zu transferieren. Nun konnte etwa 25 ml des verdünnten Heparinblutes vorsichtig ohne Vermischung auf die Ficoll-Schicht pipettiert werden und für 35 min bei 400g (1800 U/min) zentrifugiert werden. Die Zentrifugation wurde ohne Bremse durch Auslaufen beendet. Der buffy-coat mit den mononukleären Zellen (PBMCs: Monozyten und Lymphozyten) und Thrombozyten befand sich nun oberhalb des Filters zwischen Ficoll und aufgeschichtetem Serum. Dieser buffy-coat wurde sorgfältig abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und stand nach dreimaligem Waschen von je 10 min mit 300g (1500 U/min.) mit PBS-Puffer (2x) und PBS-BSA-EDTA-Puffer (1x) zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung.

2. Methodenauswahl

Um die weitere Isolation der Monozyten aus den PBMCs zu optimieren und eine möglichst hohe Reinheit und möglichst niedrige Zellschädigung zu erhalten, wurden vor der Patientenstudie verschiedenen Methoden ausgetestet. Folgende Methoden wurden evaluiert:

a.) Adhärenzmethode Nach der Dichtezentrifugation mit Ficoll wurden die mononukleären Zellen (PBMC) abgenommen, in PBS-Puffer resuspendiert und verschieden oft gewaschen. Die Zellen wurden nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer gezählt, mit Nährmedium auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt und 1 ml in kleine Petrischalen pipettiert. Nach Inkubation von 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre adhärten die Monozyten an der Oberfläche der Platten. Anschließend konnten die übrigen

Zellen im Überstand des Mediums durch mehrere Waschschrirte entfernt werden. Die adhärrierenden Zellen wurden von der Plattenoberfläche abgeschabt, gezählt und für die durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse) gefärbt und fixiert.

b.) Percoll-Dichte-zentrifugation Zur Separation der PBMCs wurde wiederum eine Ficoll-Zentrifugation durchgeführt. Die isolierten Zellen wurden in 4 ml 60%igem Percoll (hergestellt aus isoosmotischem Percoll: 9 Teile Percoll + 1 Teil 1,5 M NaCl) gelöst und zuerst mit 47,5%igem, dann mit 37%igem Percoll überschichtet. Nach einer 40minütigen Zentrifugation bei 1700g (3600 U/min) konnten zwei Pellets abgenommen werden, wobei sich in dem oberen Ring größtenteils Monozyten befanden und in dem unteren Ring vor allem Lymphozyten. Nach Waschschrirten konnten die Zellen wiederum zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt und fixiert werden.

c.) Negative Aufreinigung der Monozyten mit magnetischen Beads Magnetische Beads sind supramagnetische Partikel in der Größenordnung von zellulären Makromolekülen, welche an Antikörper gebunden sind. Die Apparatur zur Zellsortierung bestand aus einer Säule gefüllt mit Stahlwolle, umgeben von einem starken Permanentmagneten. Bei der negativen Auftrennung blieben alle störenden Zellen durch den Einsatz verschiedener Antikörper innerhalb des magnetischen Feldes an der Stahlwolle hängen, wohingegen unmarkierte Zellen (Monozyten) diese ungehindert passierten und aufgefangen werden konnten.

Materialien Alle verwendeten Reagenzien und die Zentrifuge waren auf ca. 4°C abgekühlt, um die Monozyten möglichst wenig zu stimulieren und den Erfolg der magnetischen Auftrennung zu garantieren. Für die Waschschrirte wurde zum einen reiner PBS-Puffer verwendet, zum anderen PBS-Puffer mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA (PBS-BSA-EDTA-Puffer) und zur magnetischen Auftrennung PBS-BSA-EDTA-Puffer mit 1% hitzeinaktiviertem sterilem humanem AB-Serum („Serumpuffer“). Das Medium zur Kultivierung der Zellen bestand

aus RPMI-1640 Medium mit 2mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 1% hitzeinaktiviertem sterilem humanem AB-Serum („Nährmedium“). Die Zellzählung nach Anfärbung mit Trypanblau erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die magnetische Auftrennung wurde mit dem MACS Monocyte Isolation Kit der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt.

Monozytenseparation Nach einer Ficoll-Dichtezentrifugation wurde der buffy-coat mit den mononukleären Zellen sorgfältig abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und stand nach dreimaligem Waschen von je 10 min mit 300g (1500 U/min.) mit PBS-Puffer (2x) und PBS-BSA-EDTA-Puffer (1x) zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung. Diese gewaschenen mononukleären Zellen wurden nun in 5 ml des „Serumpuffers“ (PBS-BSA-EDTA-Puffer mit 1% hitzeinaktiviertem sterilem humanem AB-Serum) resuspendiert und nach Mischung von 10 μl der Suspension mit 10 μl Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Lebendige Zellen exkludierten diesen Trypanblau-Farbstoff, während sich tote Zellen blau anfärbten. Diese Zellen wurden von der Zählung ausgeschlossen. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension ergab sich aus folgender Formel: $N \cdot V \cdot 10^4$, wobei N die Zahl der gezählten Zellen im Großquadrat, V den Verdünnungsfaktor und 10^4 den Kammerfaktor darstellten. Die Anzahl der Zellen bestimmte die Menge der später eingesetzten Antikörper. Die Zellen wurden für 10 min bei 300g (1500 U/min) zentrifugiert und der überstehende „Serumpuffer“ komplett abgehoben.

Nun erfolgte die Aufnahme des Pellets in 60 μl „Serumpuffer“ pro 10^7 Zellen mit nachfolgender Zugabe von 20 μl FcRezeptor-Blocking Reagenz pro 10^7 Zellen und 20 μl Hapten Antikörper Cocktail pro 10^7 Zellen. Das FcR-Blocking Reagenz diente zur Blockierung von FcRezeptoren, so dass diese nicht durch die Antikörper besetzt werden konnten und die Antikörper sich nur mit dem spezifischen Teil an die Oberflächenantigene der Zellen anheften konnten. Der Antikörper-Cocktail enthielt monoklonale hapten-konjugierte Antikörper gegen

CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 und anti-IgE, d.h. Antikörper gegen alle mononukleären Zellen außer Monozyten. Dieses Gemisch wurde für 5 min bei 5°C im Kühlschrank inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des 10- bis 20-fachen Volumens an „Serumpuffer“ gestoppt, erneut abzentrifugiert (10 min bei 300g) und der Überstand vollständig abgehoben. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt und das Pellet wiederum in 60 μ l „Serumpuffer“ pro 10^7 Zellen gelöst. Nach Zugabe von 20 μ l FcRezeptor-Blocking Reagenz pro 10^7 Zellen und 20 μ l Anti-Hapten Antikörper mit magnetischen Beads pro 10^7 Zellen folgte eine Inkubation von 15 min bei 5°C im Kühlschrank. Bei dieser Inkubation sollten sich die Anti-Hapten Antikörper an die hapten-konjugierten Antikörper, die bereits mit den Zellen reagiert hatten, anlagern. Im Anschluss erfolgte wiederum der Stoppvorgang mit „Serumpuffer“, eine einmalige Zentrifugation und Abheben des Überstandes. Dann wurde die magnetische Auftrennung vorbereitet, indem die Säule auf den Magneten gesteckt, mit 3 ml „Serumpuffer“ gespült wurde und auf die Säule ein mit 1 ml „Serumpuffer“ gespülter Filter gesetzt wurde. Danach konnte das vorbereitete Pellet in 500 μ l „Serumpuffer“ resuspendiert, auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen werden. Die Säule wurde dreimal mit 3 ml „Serumpuffer“ gespült und die Flüssigkeit ebenfalls gesammelt. Das gesamte Eluat enthielt nun die nicht mit magnetischen Beads besetzten Monozyten, während in der Säule die anderen mononukleären Zellen sprich Lymphozyten magnetisch festgehalten wurden. Zur Eluation der Lymphozyten wurde die Säule vom Magneten genommen, auf ein Röhrchen gesetzt und mit 1ml „Serumpuffer“ ausgespült. Diese Zellen dienten dann zur DNA-Gewinnung zur Typisierung der Mutationen bei den Probanden. Dagegen wurden die Zellen aus dem durchgelaufenen Eluat, das größtenteils Monozyten enthielt, gezählt und mit dem Nährmedium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Diese Zellsuspension konnte dann zur Kultivierung und Weiterverarbeitung verwendet werden.

2.3.3 FACS-Analyse

Mit der Methode der Durchflusszytometrie lassen sich in einem FACS-Gerät (Fluorescence Activated Cell Sorter) Zellen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen spezielle Oberflächenantigene auftrennen, da die verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Oberflächenantigene aufweisen.

Um die Reinheit der isolierten Monozyten zu überprüfen, wurde von der oben hergestellten Zellsuspension 300 μl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und für die FACS-Analyse weiterverarbeitet. Dabei musste zunächst einmal die Suspension von Erythrozyten befreit werden, da diese bei der FACS-Analyse mitgezählt würden und zu falschen Ergebnissen führen würden. Dazu wurde zu den 300 μl der Zellsuspension etwa 1 ml Erythrozytenlysepuffer gegeben und für 15 min lysiert. Nach Abzentrifugation (in einer kleinen Zentrifuge 3 min bei 2000 U/min) und Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen mit einem 1:10 verdünnten CD14-FITC/CD3-APC-Antikörpergemisch für 20–30 min auf Eis inkubiert. Der CD14-FITC-Antikörper diente zur Markierung der Monozyten, der CD3-APC-Antikörper zur Gegenfärbung der Lymphozyten. Pro Messreihe wurde von einem Probanden noch eine zweite Probe verwendet, die mit IgG inkubiert wurde. Sie diente als Isotypkontrolle zur Festlegung der Abtrennung von den nicht gefärbten Zellen. Nach der Inkubation wurde mit 700 μl FACS-Puffer (PBS-Puffer mit 5%igem fetalem Kälberserum) gewaschen, der Überstand dekantiert und mit 300 μl 1%igem Paraformaldehyd-Puffer (PFA-Puffer) fixiert. Diese fixierten Zellen wurden bis zur Messung nach Ansammlung mehrerer Proben bei -20°C eingefroren. Zur Messung an dem Durchflusszytometer wurden die Proben aufgetaut und nach Reinigung und Spülung des FACScan analysiert.

Nach Auswertung der Daten wurde die negative Aufreinigung der Monozyten mit magnetischen Beads (MACS-Methode) als die beste erachtet (siehe Kapitel 3.2). Sie zeigte die größte Reinheit der Monozyten und die niedrigste Zellschädigungsrate, die nur durch Anfärbung mit Trypanblau beim Auszählen im Lichtmi-

kroskop abgeschätzt und nicht genauer quantifiziert wurde.

2.3.4 Zellkultur und Stimulation mit LPS bzw. MDP

Für die Zellkultur wurden aus der Zellsuspension ($1 \times 10^6/\text{ml}$) Aliquots von je $200 \mu\text{l}$ in die Löcher einer 48-well Kulturplatte gefüllt und über Nacht unter standardisierten Bedingungen, d.h. bei 37°C und unter 5%iger CO_2 - und wasserstoffgesättigter Atmosphäre, im Brutschrank kultiviert.

Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium vollständig abgesaugt — die Monozyten adhärten am Boden der Kulturplatte — und durch $200 \mu\text{l}$ eines neuen Nährmediums ersetzt. Das frische Nährmedium enthielt entweder 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) von *E.coli* 055:B5, 100 ng/ml Muramyl-dipeptid (MDP) zur Stimulation der Monozyten oder Medium ohne stimulierenden Zusatz. Nach 1.5, 6 und 9 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände abpipetiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Alle Experimente wurden in zwei- oder dreifacher Form ausgeführt.

2.3.5 Zytokinmessungen

Die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ und IL10 in den eingefrorenen Zellüberständen 6 und 9 Stunden nach Stimulation wurde mit einem Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) quantifiziert. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

Erstellung einer Zeitkurve

Als Vorarbeit wurde eine Zeitkurve zur Ermittlung des Zeitpunktes der höchsten Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und IL10 erstellt, indem zu verschiedenen Zeitpunkten (1.5, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden nach Stimulation) Überstand aus eigenen Proben abgenommen wurde. Dabei stellte sich der Zeitpunkt nach 6 Stunden als der Geeignetest heraus.

Materialien

Die Messung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mit einem TNF α - bzw. IL10-ELISA der Firma Biosource Europe, Nivelles, Belgien. Weiterhin wurde ein horizontaler Schüttler, eine Multipette mit 2,5 ml Combitips und eine Transferpette zum Waschen der Platten benutzt. Die photometrische Auswertung erfolgte mittels eines PC-gesteuerten Mikroplatten-Lesegeräts (Synelisa 5.0) und dazugehöriger Software.

TNF α -ELISA

Zu jeder Messung wurde eine Standardkurve mit aufsteigenden Standardkonzentrationen erstellt, die zur Ermittlung der jeweiligen Messwerte diente. Die untere Nachweisgrenze lag bei 3 pg/ml.

Nach Anleitung wurden zunächst die Reagenzien, Standards und Kontrollen mit Aqua dest aufgelöst und Lösungen angesetzt. Danach erfolgte eine 1:10 Verdünnung der Proben (20 μ l Überstand + 180 μ l RMPI-Medium ergibt ein in den Test einzusetzendes Volumen von 200 μ l).

Die Durchführung des ELISA begann mit der Pipettierung von 50 μ l Inkubationspuffer und 200 μ l der Standards 0–5, der Kontrollen und der verdünnten Proben in die mit TNF α -Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte und anschließender Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler bei 700 rpm. Hierauf wurde dreimal mit einer Waschlösung gewaschen und 100 μ l Standard 0 sowie 50 μ l anti-TNF α -Konjugat zugegeben, danach wiederum für 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde wieder dreimal gewaschen und 200 μ l der Chromogen-Lösung zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation konnte die Reaktion mit 50 μ l Stopplösung beendet werden. Die photometrische Auswertung erfolgte innerhalb von 1 Stunde bei einer Absorption von 570 nm. Anhand der Standardkurve wurde die Konzentration von TNF α in den Proben bestimmt.

IL10-ELISA

Zu jeder Messung wurde eine Standardkurve mit aufsteigenden Standardkonzentrationen erstellt, die zur Ermittlung der jeweiligen Messwerte diente. Die untere Nachweisgrenze lag bei 1 pg/ml.

Die Vorbereitung verlief gleich dem TNF α -ELISA, allerdings ohne Verdünnung der Zellüberstände.

Zu Beginn des Test wurde 100 μ l Solution B für die Standards und Kontrollen bzw. 100 μ l Solution A für die Überstände und 100 μ l der Standards 0–5, Kontrollen und Proben aufpipettiert. Inkubation und Waschschrte glichen dem TNF α -ELISA. Dann wurde 100 μ l Solution A und 50 μ l Anti-IL10-HRP zugegeben und wieder inkubiert und gewaschen. Die Färbung, das Stoppen der Reaktion und die Messung erfolgte wie beim TNF α -ELISA.

2.3.6 Genotypisierung

Die Genotypisierung bezüglich der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen (L1007fs, G908R und R702W) erfolgte mittels einer Multiplex Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit mutationsspezifischen Primern (für L1007fs) und Sequenzanalyse [Rad02] oder mittels Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP, für G908R und R702W) [Tor04].

2.3.7 mRNA-Expression

Parallel zu diesen Experimenten wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe des chirurgischen Forschungslabors Innenstadt der LMU München die mRNA-Expression quantifiziert. Dazu wurden die Monozyten nach Abnahme des Überstandes lysiert und bei -80°C eingefroren. Dieses Material wurde dann von der Arbeitsgruppe zur Ermittlung der TNF α - und IL10-mRNA-Expression in den Zellen weiterverarbeitet (Dissertation S. Wagner, [Wag04]).

2.3.8 Statistik

Zur Datenerfassung diente das Programm EXCEL von Microsoft, zur statistischen Auswertung das Programm „Statistical Package for the Social Sciences 11.5“ (SPSS) für Windows. Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte bei den abhängigen Stichproben mit dem Wilcoxon-Test, bei den unabhängigen Stichproben mit dem Mann Whitney U-Test. Die Signifikanzgrenze wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Methodenauswahl zur Monozytenisolation

Da die Monozyten in der Pathogenese von M. Crohn eine wichtige Rolle spielen und sie stark NOD2 exprimieren, sollten für diese Arbeit Monozyten aus peripherem Venenblut der Patienten gewonnen werden. Um eine Optimierung der Reinheit der Monozyten nach der Isolation und eine möglichst geringe Zellschädigungsrate zu erreichen, wurden vor der Patientenstudie verschiedene Methoden ausgetestet. Die Reinheit der Monozyten wurde mittels FACS-Analyse ermittelt, die Zellschädigung wurde durch Anfärbug mit Trypanblau beim Auszählen im Lichtmikroskop abgeschätzt. Bei der Adhärenzmethode ergaben sich Reinheiten der Monozyten von 28-58%, wobei die besten Ergebnisse beim häufigsten Waschen erlangt wurden. Bei der Percoll-Dichtezentrifugation lag die Reinheit der Monozyten bei 50-71%, während bei der magnetischen Auftrennung Werte von 85-86% erreicht wurden (Abb. 3.1). Daher wurde die Methode der negativen Aufreinigung mittels MACS für die Isolation der Monozyten ausgewählt.

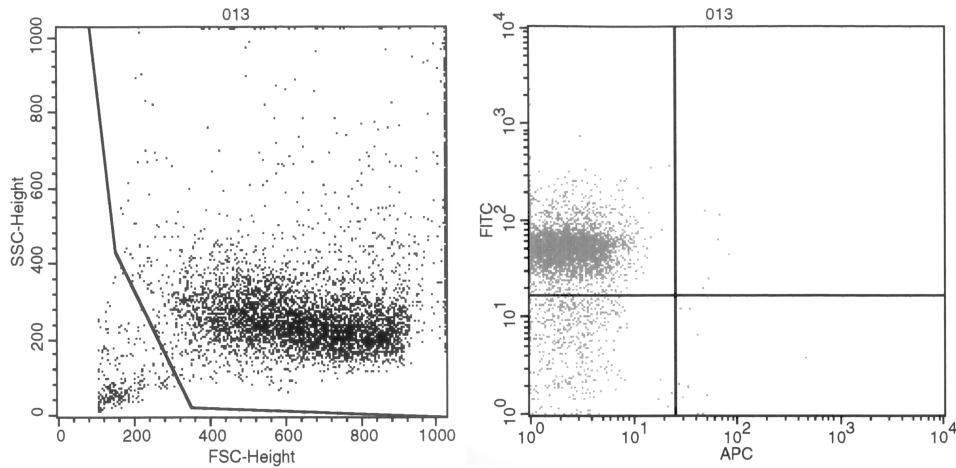


Abb. 3.1: FACS-Plot als Beispiel für eine Analyse der Reinheit der Monozyten eines Patienten nach magnetischer Auftrennung. Die Reinheit der Monozyten lag hier bei 90,4%.

3.2 Erstellung einer Zeitkurve

Die Zeitkurve zur Ermittlung des Zeitpunktes der höchsten Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ und IL10 (1.5, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden nach Stimulation) erbrachte als geeignetsten Zeitpunkt 6 Stunden nach Stimulation, auch wenn die maximale IL10-Sekretion zu einem späteren Zeitpunkt stattfand (Abb. 3.2 und 3.3).

3.3 LPS-Stimulation: Teil 1

Im ersten Teil des Experiments wurden ohne damalige Kenntnis des Moleküls Muramyldipeptid (MDP), das als kleinster Bestandteil von Peptidoglycan (PGN) NOD2 aktivieren kann, die Versuche nur mit Lipopolysaccharid (LPS) durchgeführt. Es wurden vier verschiedene Studienpopulationen verglichen: zum einen eine gesunde Kontrollgruppe ohne den drei Mutationen im CARD15-Gen, zum anderen M. Crohn Patienten mit Wildtyp-CARD15-Genotyp und heterozygotem Genotyp bezüglich der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen im CARD15-Gen und M. Crohn Patienten mit homozygoter L1007fs-Mutation.

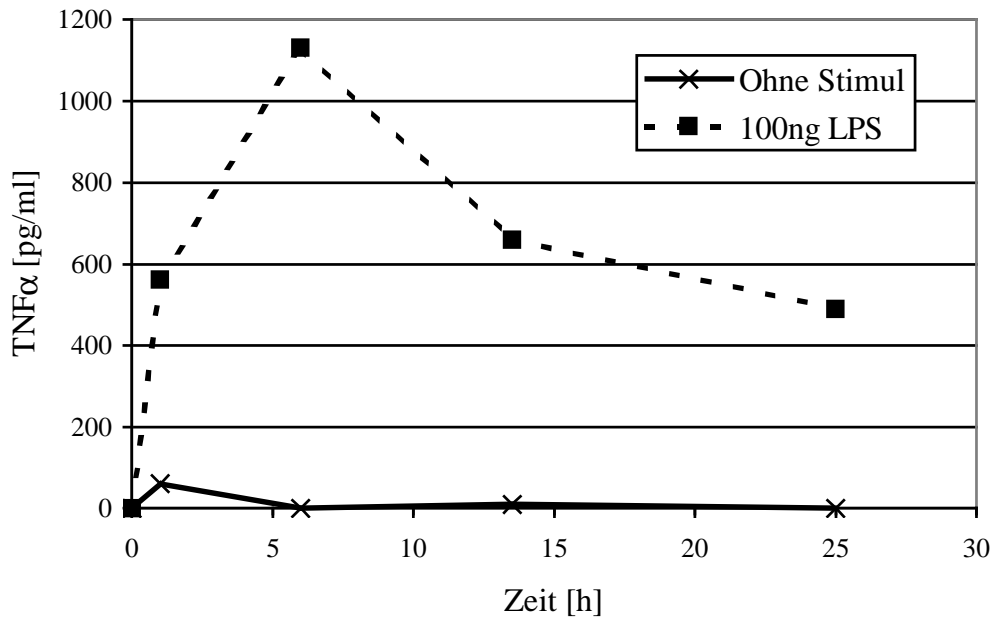


Abb. 3.2: Zeitkurve zur Ermittlung der maximalen Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$ nach Stimulation mit LPS.

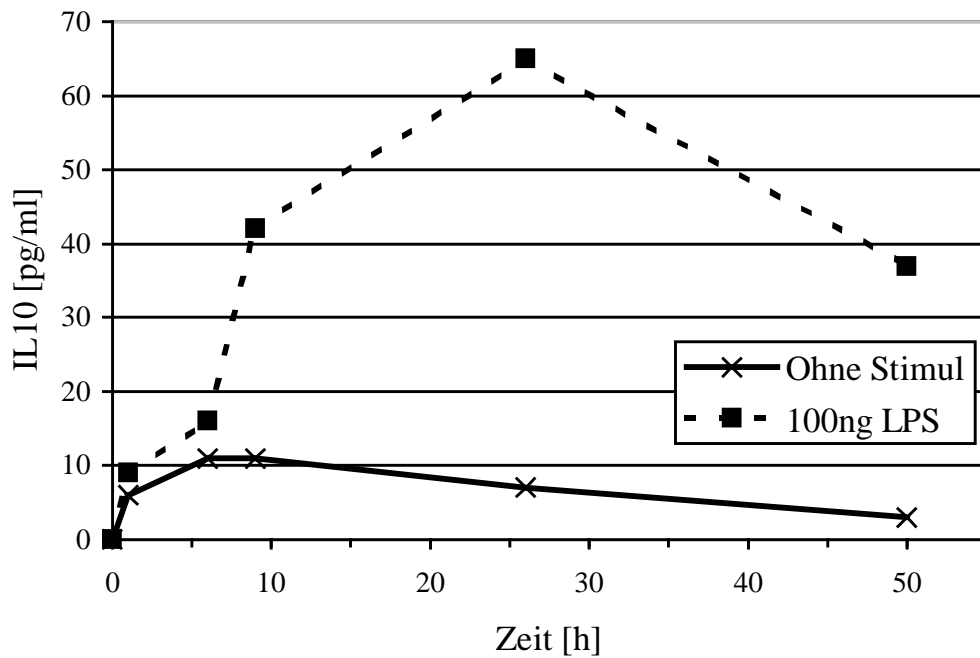


Abb. 3.3: Zeitkurve zur Ermittlung der maximalen Freisetzung von IL10 nach Stimulation mit LPS.

3.3.1 TNF α -Sekretion

Abbildung 3.4 zeigt die Mittelwerte der TNF α -Produktion der einzelnen Populationen in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp. Die TNF α -Werte im Kulturüberstand 6 Stunden ohne Stimulation bzw. 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS wurden mittels ELISA ermittelt. Alle Monozytenpopulationen zeigten eine signifikant erhöhte TNF α -Produktion im Kulturüberstand nach

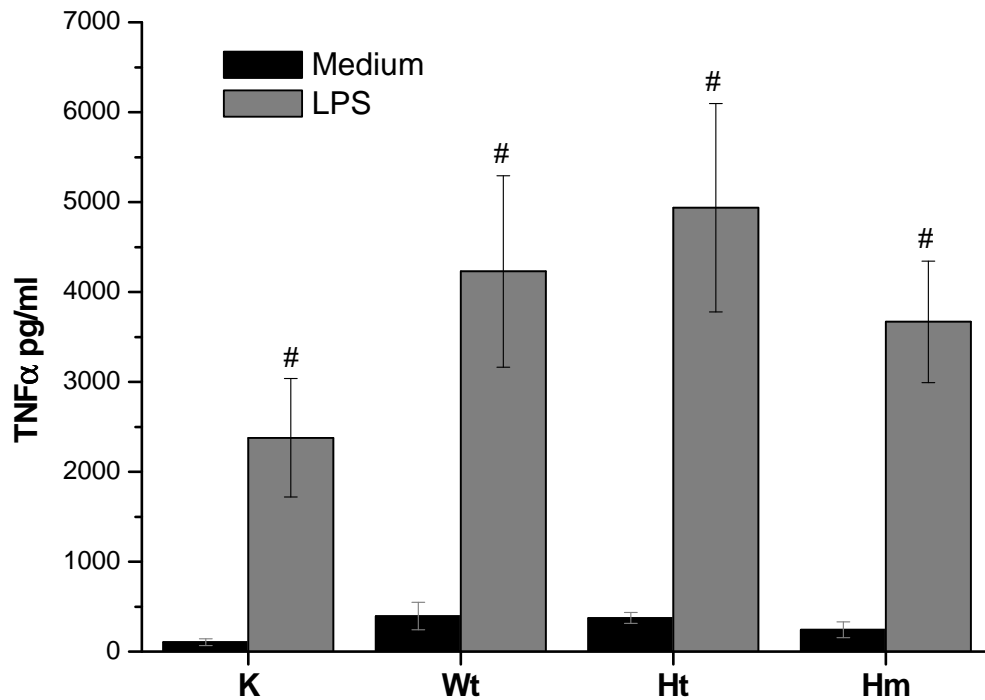


Abb. 3.4: LPS-induzierte TNF α -Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp. Die TNF α -Spiegel wurden im Kulturüberstand 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS mittels ELISA bestimmt. K—Kontrollen (n=5, wt), Wt—Wildtyp (n=6), Ht—heterozygote (n=5, 2xL1007fs/wt, 2xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs) Patienten mit M. Crohn. Werte \pm SEM.

#: $p < 0,05$ zwischen unstimulierten und stimulierten Monozyten.

LPS-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten ($p_K = 0,043$, $p_{Wt} = 0,028$, $p_{Ht} = 0,028$, $p_{Hm} = 0,043$).

Abbildung 3.5 zeigt die einzelnen TNF α -Werte der Monozyten im Kulturüberstand der jeweiligen Population als Differenz (Δ) zwischen unstimulierten und mit 100 ng/ml LPS-stimulierten Monozyten. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der TNF α -Sekretion zwischen den einzelnen Studienpopulationen ($p > 0,05$).

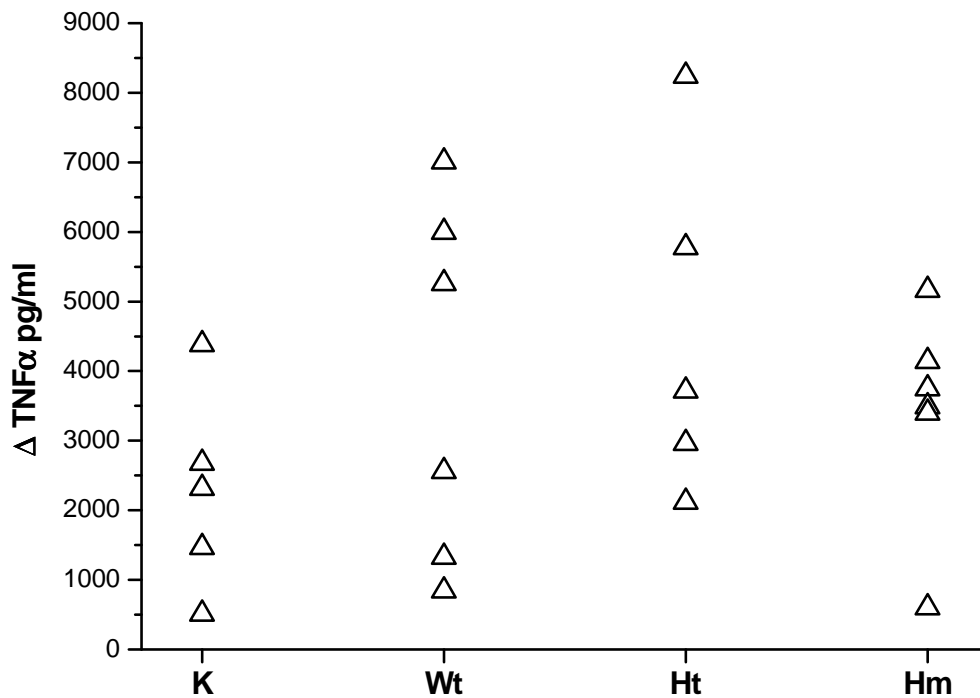


Abb. 3.5: Differenz (Δ) zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter TNF α -Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen. K—Kontrollen (n=5, wt), Wt—Wildtyp (n=6), Ht—heterozygote (n=5, 2xL1007fs/wt, 2xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs) Patienten mit M. Crohn. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen der LPS-induzierten TNF α -Produktion in den einzelnen Studienpopulationen.

3.3.2 IL10–Sekretion

In denselben Kulturüberständen der Monozyten wurde neben der $\text{TNF}\alpha$ –Freisetzung auch die Sekretion von Interleukin 10 (IL10) mittels ELISA gemessen. Abbildung 3.6 zeigt die Mittelwerte der IL10–Produktion der einzelnen Populationen in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp. Die IL10–Werte im Kulturüberstand 6 Stunden LPS–Zugabe bzw. 6 Stunden nach Stimulation mit

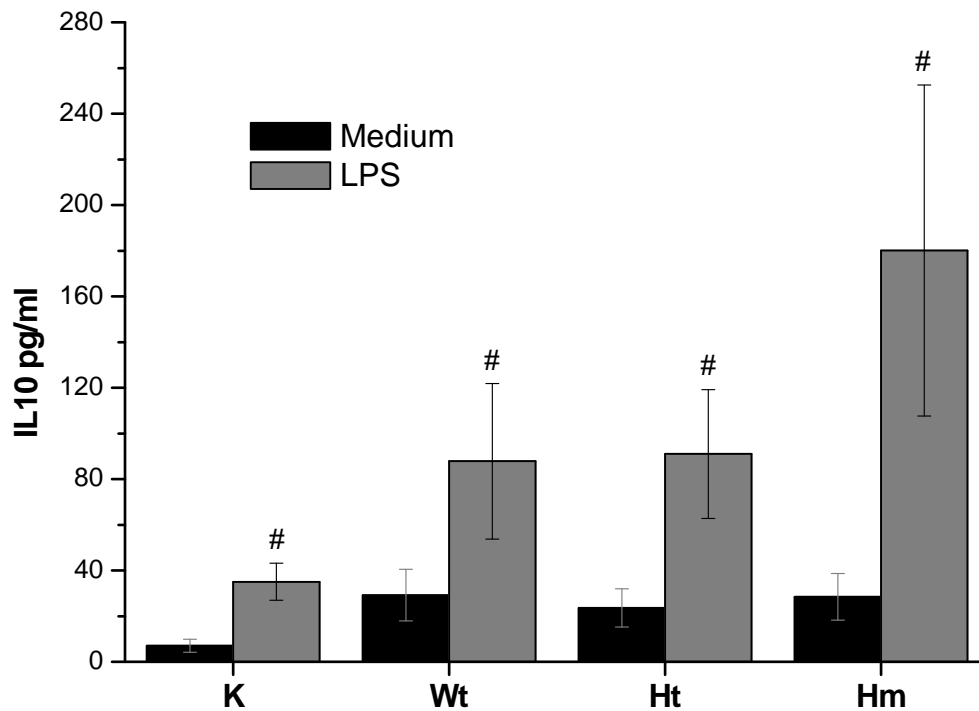


Abb. 3.6: LPS–induzierte IL10–Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp. Die IL10–Spiegel wurden im Kulturüberstand 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS mittels ELISA bestimmt. K–Kontrollen (n=5, wt), Wt–Wildtyp (n=6), Ht–heterozygote (n=5, 2xL1007fs/wt, 2xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm–homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs) Patienten mit M. Crohn. Werte \pm SEM.

p: < 0,05 zwischen unstimulierten und stimulierten Monozyten.

100 ng/ml LPS wurden mittels ELISA ermittelt. Alle Monozytenpopulationen zeigten eine signifikant erhöhte IL10-Produktion im Kulturüberstand nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten ($p_K = 0,043$, $p_{Wt} = 0,043$, $p_{Ht} = 0,027$, $p_{Hm} = 0,043$).

Abbildung 3.7 zeigt die einzelnen IL10-Werte der Monozyten im Kulturüberstand der jeweiligen Population als Differenz (Δ) zwischen unstimulierten und

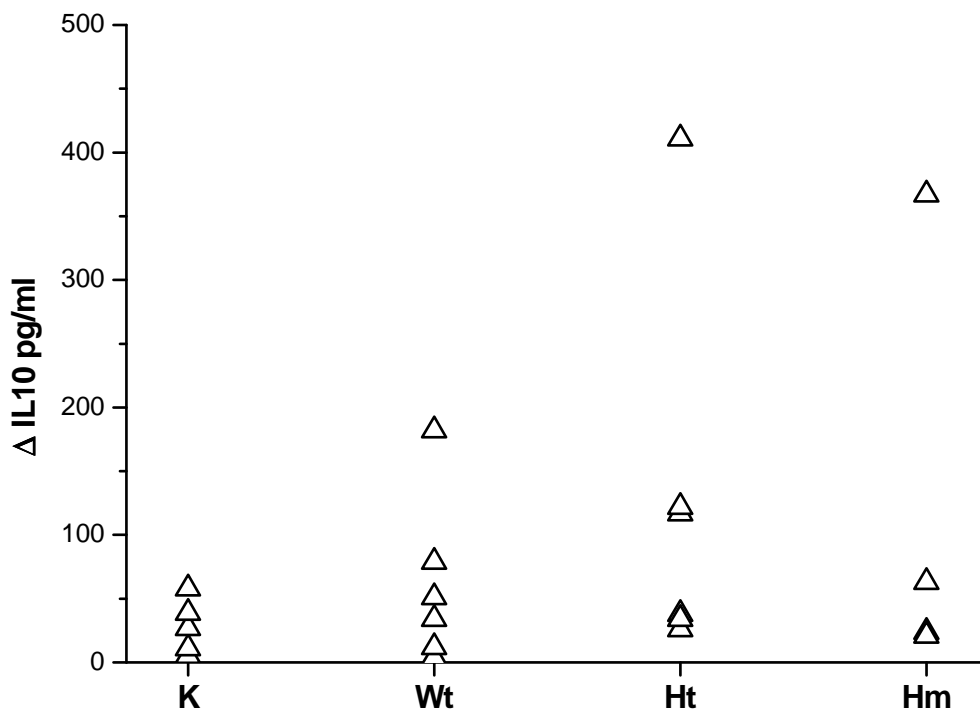


Abb. 3.7: Differenz (Δ) zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter IL10-Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen. K—Kontrollen (n=5, wt), Wt—Wildtyp (n=6), Ht—heterozygote (n=5, 2xL1007fsinsC/wt, 2xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs) Patienten mit M. Crohn.

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen der LPS-induzierten IL10-Produktion in den einzelnen Studienpopulationen.

mit 100 ng/ml LPS-stimulierten Monozyten. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der IL10-Sekretion zwischen den einzelnen Studienpopulationen ($p > 0,05$).

3.4 MDP- und LPS-Stimulation: Teil 2

Im zweiten Teil der Untersuchung wurden die Versuche mit MDP und LPS als Kontrolle für eine TLR4-vermittelte NF- κ B-Aktivierung als Stimulationsmoleküle der Monozyten durchgeführt. Dabei wurden fünf verschiedene Studienpopulationen verglichen: eine gesunde Kontrollgruppe und M. Crohn Patienten mit Wildtyp bezüglich der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen im CARD15-Gen, mit heterozygotem Genotyp, mit compound heterozygotem Genotyp und M. Crohn Patienten mit homozygoter L1007fs-Mutation im CARD15-Gen.

3.4.1 TNF α -Sekretion

Monozyten von gesunden Kontrollen, Wildtyp-Patienten und heterozygoten Patienten zeigten eine signifikant erhöhte Sekretion von TNF α im Überstand 6 Stunden nach MDP-Stimulation im Vergleich zu Monozyten, die nicht stimuliert wurden ($p_K = 0,003$, $p_{Wt} = 0,005$, $p_{Ht} = 0,003$) (Abb.3.8). In Monozyten von Individuen mit dem homozygoten Genotyp bezüglich der L1007fs-Mutation im CARD15-Gen wurde keine TNF α -Freisetzung nach Stimulaion mit MDP beobachtet ($p_{Hm} = 0,352$). Die TNF α -Werte in Zellkulturüberständen von Monozyten ohne und mit Zugabe von MDP waren ähnlich, es ergab sich kein signifikanter Unterschied vor und nach Stimulation mit MDP. Ein ähnlicher Effekt wie bei der MDP-Stimulation wurde nach LPS-Stimulation beobachtet, wobei hier erwartungsgemäß auch die Monozyten der Patienten mit homozygoter L1007fs-Mutation mit einer signifikant erhöhten TNF α -Produktion reagierten ($p_K = 0,018$, $p_{Wt} = 0,036$, $p_{Ht} = 0,012$, $p_{Hm} = 0,002$) Bei den compound he-

terozygoten Patienten ist eine statistische Auswertung aufgrund der geringen Anzahl der Patienten nicht sinnvoll, aber es lässt sich die Tendenz erkennen, dass die Stimulation durch MDP eine geringere $\text{TNF}\alpha$ -Ausschüttung als mit LPS zur Folge hat, während bei den anderen Populationen außer den L1007fs-Homozygoten MDP eher eine höhere $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion als LPS auslöst (Abb. 3.8).

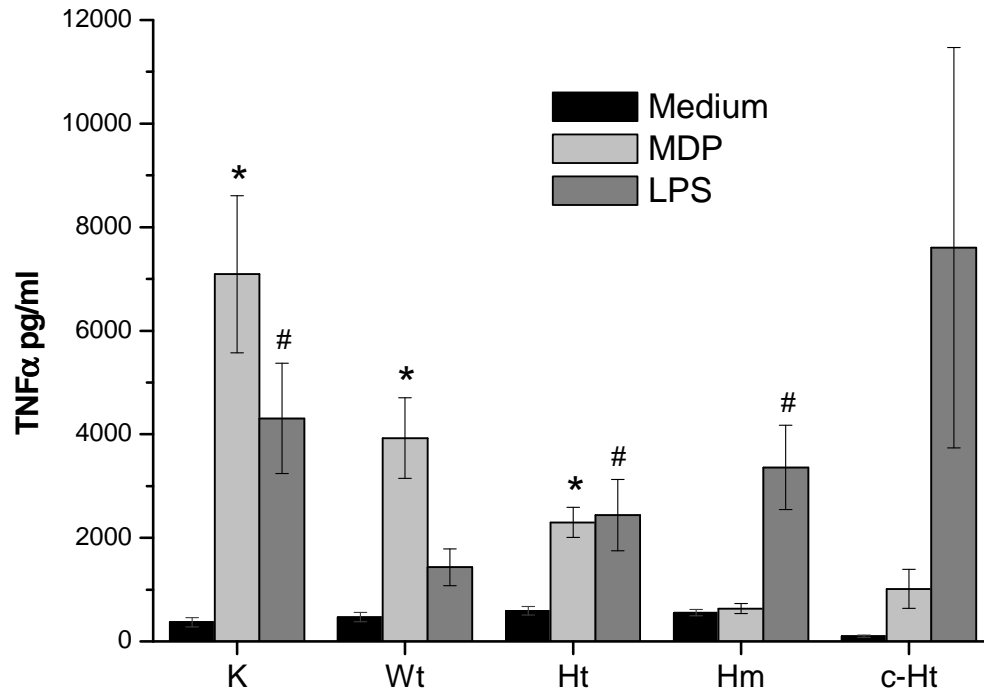


Abb. 3.8: MDP- und LPS-induzierte $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp. Die $\text{TNF}\alpha$ -Spiegel wurden im Kulturüberstand 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml MDP bzw. 100 ng/ml LPS mittels ELISA bestimmt. K—Kontrollen (n=4, wt), Wt—Wildtyp (n=4), Ht—heterozygote (n=4, 2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs), c-Ht—compound heterozygote (n=2, L1007fs/G908R, L1007fs/R702W) Patienten mit M. Crohn. Werte \pm SEM.

* $p < 0,05$ zwischen unstimulierten und MDP-stimulierten Monozyten.

$p < 0,05$ zwischen unstimulierten und LPS-stimulierten Monozyten.

Bei Verwendung des Anstiegs der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion (\odot =Differenz zwischen den Werten von unstimulierten und stimulierten Monozyten) ergab sich nach MDP-Stimulation ein signifikant höherer Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in der Kontrollgruppe als in der Gruppe der L1007fs-Homozygoten ($p = 0,0190$), ebenso zwischen Wildtyp- bzw. den heterozygoten Patienten und den L1007fs-Homozygoten (jeweils $p = 0,0105$). Im Gegensatz dazu besteht kein signifikant höherer Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in den Kontrollen im Vergleich zu den restlichen Studienpopulationen, auch untereinander ($p > 0,05$) (Abb. 3.9).

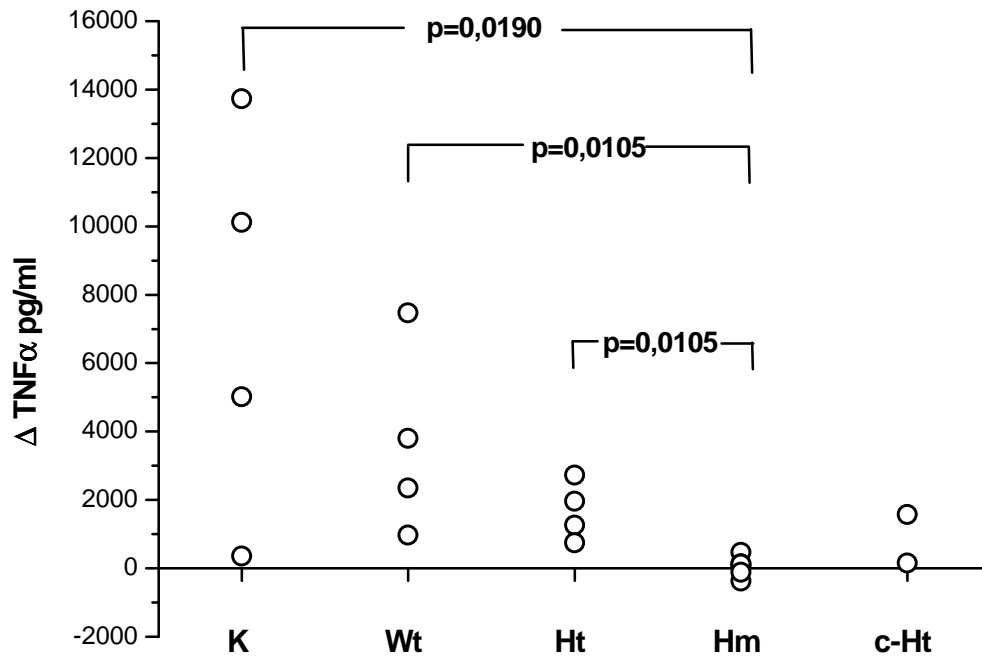


Abb. 3.9: Differenz (○) zwischen unstimulierter und MDP-stimulierter $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml **MDP** bei unterschiedlichen **NOD2/CARD15** Genotypen. K—Kontrollen (n=4, wt), Wt—Wildtyp (n=4), Ht—heterozygote (n=4, 2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs), c-Ht—compound heterozygote (n=2, L1007fs/G908R, L1007fs/R702W) Patienten mit M. Crohn.

Bei der LPS-Stimulation lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der TNF α -Freisetzung zwischen den einzelnen Gruppen feststellen (Abb. 3.10).

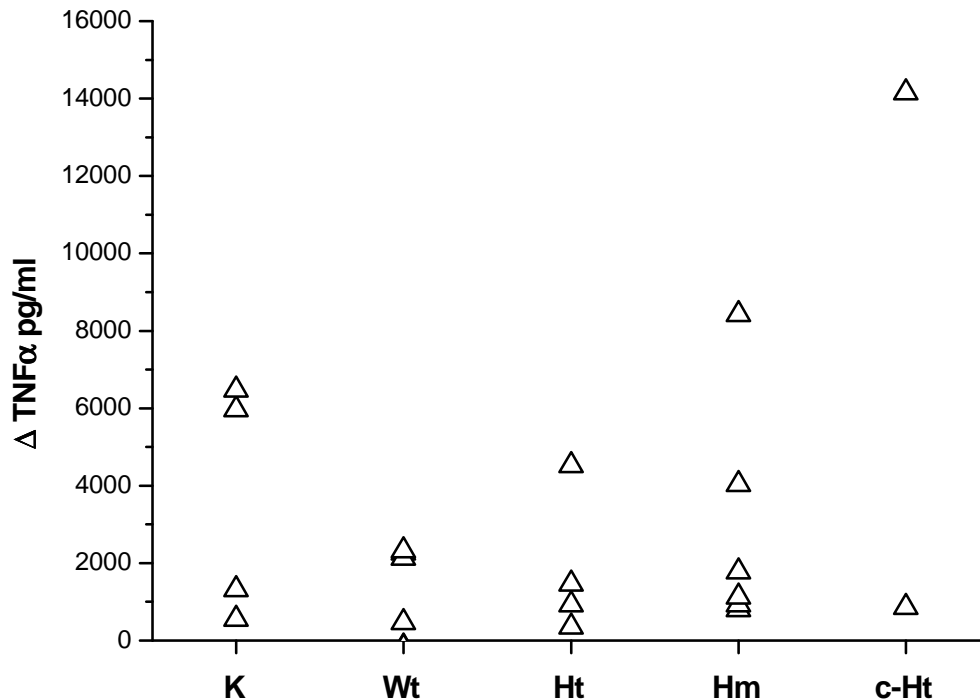


Abb. 3.10: Differenz (Δ) zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter TNF α -Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml **LPS** bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen. K—Kontrollen (n=4, wt), Wt—Wildtyp (n=4), Ht—heterozygote (n=4, 2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs), c-Ht—compound heterozygote (n=2, L1007fs/G908R, L1007fs/R702W) Patienten mit M. Crohn. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der TNF α -Freisetzung zwischen den einzelnen Populationen.

3.4.2 IL10–Sekretion

Aus denselben Kulturüberständen der Monozyten wurde neben der $\text{TNF}\alpha$ –Freisetzung auch die Sekretion von Interleukin 10 (IL10) mittels ELISA gemessen. Dabei zeigten nur die Monozyten der Kontrollen, der Wildtyp–Patienten und der heterozygoten Patienten eine signifikant erhöhte IL10–Sekretion nach MDP–Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Monozyten ($p_K = 0,003$, $p_{Wt} = 0,007$, $p_{Ht} = 0,003$) (Abb. 3.11). In Monozyten von Individuen mit dem homozygoten Genotyp bezüglich der L1007fs–Mutation im CARD15–Gen wurde keine $\text{TNF}\alpha$ –Freisetzung nach Stimulaion mit MDP beobachtet ($p_{Hm} = 0,330$). Nach LPS–Stimulation kam es zu keiner signifikant erhöhten IL10–Freisetzung im Vergleich zu unstimulierten Monozyten ($p > 0,05$).

Bei Verwendung des Anstiegs der IL10–Produktion (\odot =Differenz zwischen den Werten von unstimulierten und stimulierten Monozyten) ergab sich nach MDP–Stimulation ein signifikant höherer Anstieg der IL10–Freisetzung in der Kontrollgruppe als in der Gruppe der L1007fs–Homozygoten ($p = 0,0105$), ebenso zwischen Wildtyp– bzw. den heterozygoten Patienten und den L1007fs–Homozygoten ($p = 0,0105$ bzw. $p = 0,033$) (Abb. 3.12). Ebenso bestand eine signifikant höherer Anstieg der IL10–Produktion bei den heterozygoten Patienten als in der Kontrollgruppe ($p = 0,0209$). Ansonsten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, auch nicht bezüglich der LPS–Stimulation (Abb. 3.13).

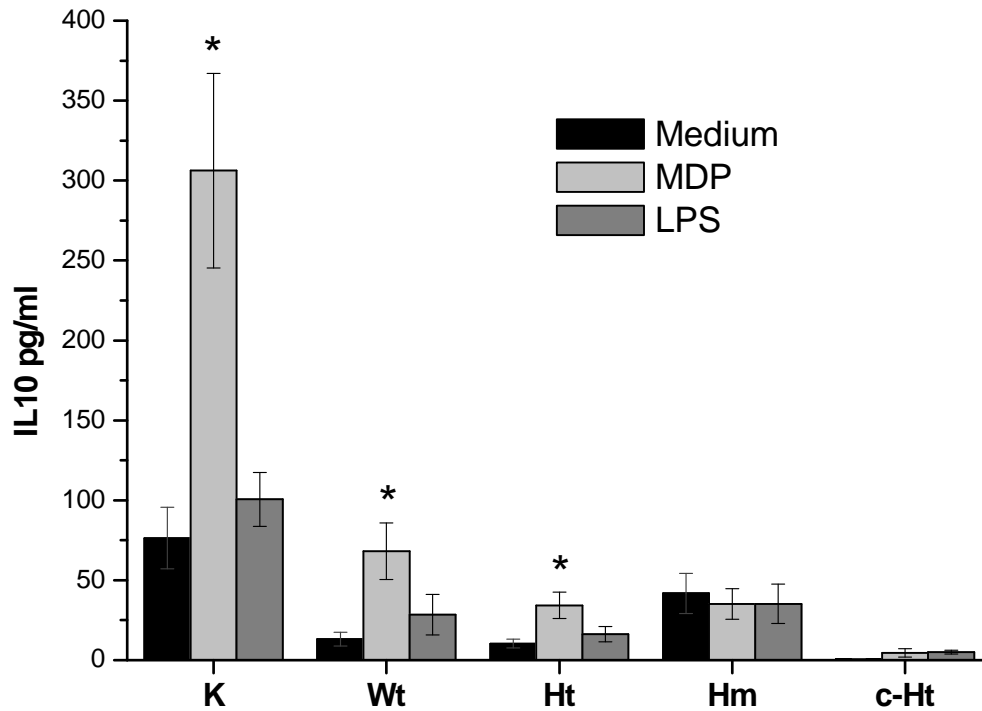


Abb. 3.11: MDP- und LPS- induzierte IL10-Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp. Die IL10-Spiegel wurden im Kulturüberstand 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml MDP bzw. 100 ng/ml LPS mittels ELISA bestimmt. K—Kontrollen (n=4, wt), Wt—Wildtyp (n=4), Ht—heterozygote (n=4, 2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs), c-Ht—compound heterozygote (n=2, L1007fs/G908R, L1007fs/R702W) Patienten mit M. Crohn. Werte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen unstimulierten und MDP-stimulierten Monozyten.

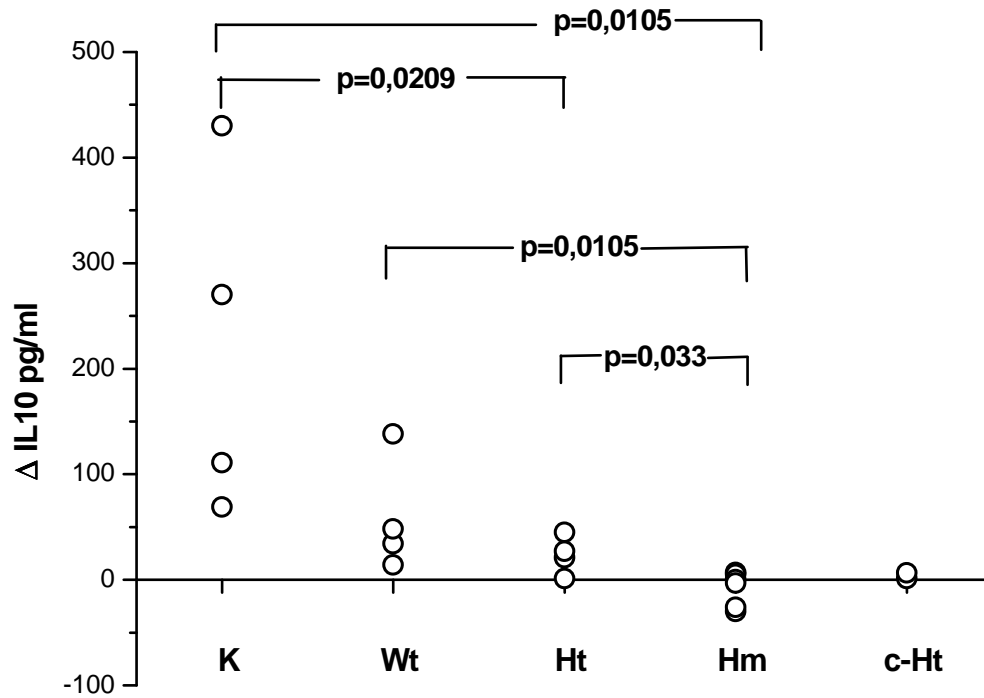


Abb. 3.12: Differenz (○) zwischen unstimulierter und MDP-stimulierter IL10-Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml **MDP** bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen. K—Kontrollen (n=4, wt), Wt—Wildtyp (n=4), Ht—heterozygote (n=4, 2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs), c-Ht—compound heterozygote (n=2, L1007fs/G908R, L1007fs/R702W) Patienten mit M. Crohn.

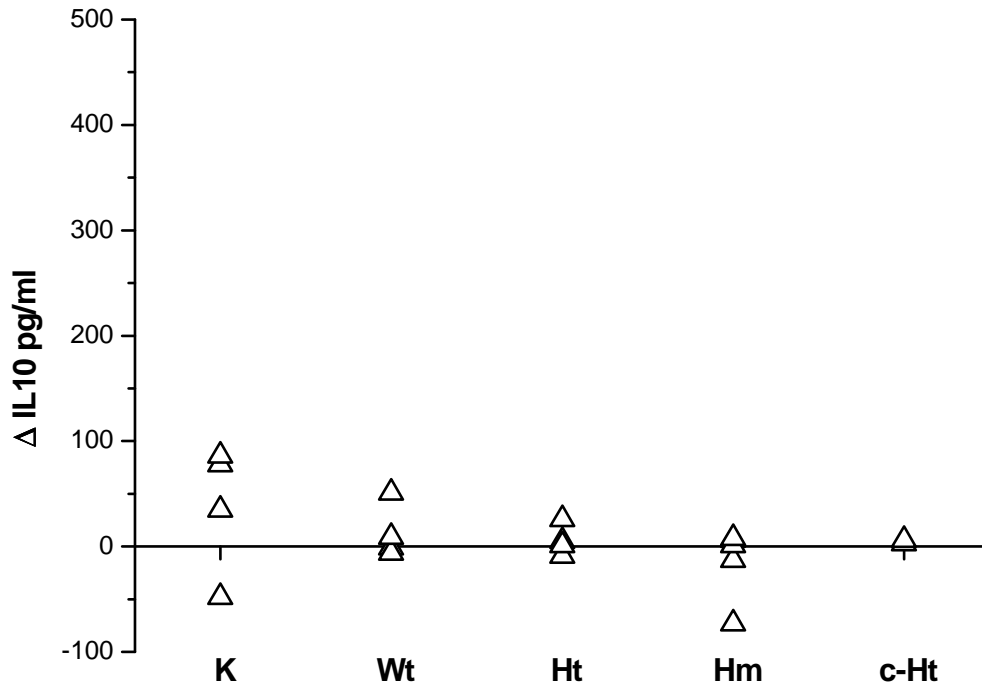


Abb. 3.13: Differenz (Δ) zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter IL10-Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml **LPS** bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen. K—Kontrollen (n=4, wt), Wt—Wildtyp (n=4), Ht—heterozygote (n=4, 2xL1007fs/wt, 1xR702W/wt, 1xG908R/wt), Hm—homozygote (n=6, L1007fs/L1007fs), c-Ht—compound heterozygote (n=2, L1007fs/G908R, L1007fs/R702W) Patienten mit M. Crohn. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der IL10-Freisetzung zwischen den einzelnen Populationen.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Mögliche systematische Fehler

4.1.1 Vorstimulation der Zellen

Eine Vorstimulation der isolierten Monozyten ist durch viele Faktoren möglich und kann dann zu erheblich verfälschten Ergebnissen führen. So sind bakterielle Kontaminationen wegen ihrer Zellwandbestandteile wie LPS und PGN eine gefährliche Quelle, die zu einer Stimulation der Monozyten zur Zytokinproduktion vor der gewünschten Stimulation führen. Deshalb wurden sämtliche Arbeitsschritte unter einer Laminar Air Flow unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Auch die Methode zur Isolation der Monozyten spielt eine wichtige Rolle. Auch deshalb wurde die magnetische Auftrennung ausgewählt, die im Vergleich zur Dichtezentrifugation zu einer geringeren Stimulation der Immunzellen führt [Zah97]. Ein entscheidender Vorteil dieser negativen Auftrennung sind die unbesetzten CD14-Rezeptoren der Monozyten mit weitgehender Vermeidung einer durch die Antikörper-Bindung verursachten intrazellulären Aktivierung, was bei einer mittels CD14-positiven Zelldifferenzierung weniger der Fall ist. Ein weiterer Faktor sind höhere Temperaturen, die zu einer Vorstimulation der Zellen führen können, so dass die verwendeten Reagenzien und die Zentrifuge auf 4°C abgekühlt wur-

den und die Inkubationen im Kühlschrank erfolgten. Auch lagen zwischen der Probengewinnung und der Weiterverarbeitung maximal 3 Stunden.

4.1.2 Isolationsmethode

Mögliche systematische Fehler bei der Isolationsmethode lagen vor allem in der Herstellung falscher Verdünnungen, die fast in allen Arbeitsschritten durchzuführen waren. Eine zweite mögliche Fehlerquelle lag in der Reinheit der Monozyten, die mittels Durchflusszytometrie quantifiziert wurde, aber bei den Patienten teilweise nicht exakt gleiche Werte ergaben (70–92%). Diese Unterschiede sind aufgrund der Arbeit mit lebenden Zellen und der schwierigen Arbeitsmethode nicht ganz zu vermeiden.

4.2 Bewertung der Ergebnisse

Morbus Crohn ist eine Erkrankung, bei der die Pathogenese noch weitgehend ungeklärt ist. Die aktuellste und derzeit gebräuchlichste Theorie hinsichtlich der Pathogenese geht von einer Störung der mukosalen Immunantwort gegenüber der bakteriellen Darmflora in genetisch prädisponierten Individuen aus. Wie die genetische Disposition eine Störung der mukosalen Immunantwort bewirkt, ist Inhalt zahlreicher Studien, konnte bisher allerdings noch nicht hinreichend geklärt werden. Im Sommer 2001 wurde das erste mit M. Crohn assoziierte Gen bei Kaukasiern identifiziert: NOD2/CARD15. Etwa 30–40% der Patienten mit M. Crohn weisen Mutationen (L1007fs, R702W, G908R) in diesem Gen auf.

4.2.1 Monozytäre Zytokinproduktion in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp nach LPS-Stimulation

Frühere *in vitro* Studien an mit CARD15-transfizierten embryonalen Nierenzellen haben gezeigt, dass Mutationen des CARD15-Gens zu einer verringerten NF-

κ B-Aktivierung nach Stimulation mit LPS und PGN führen [Ogu01a, Bon03a]. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob die L1007fs-Mutation des CARD15-Gens die monozytäre Bildung von proinflammatorischen ($\text{TNF}\alpha$) und antiinflammatorischen (IL10) Zytokinen nach Kontakt mit LPS beeinflusst.

a.) Zum einen wurde beobachtet, dass alle Monozytenpopulationen eine signifikant erhöhte $\text{TNF}\alpha$ -Produktion im Kulturüberstand nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den unstimulierten Monozyten zeigten.

b.) Zum anderen kam es beim Vergleich zwischen der $\text{TNF}\alpha$ - bzw. IL10-Produktion zwischen den einzelnen Populationen nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) zu keinen signifikanten Unterschieden in der Zytokinproduktion der Monozyten von L1007fs-homozygoten Patienten im Vergleich zu Monozyten von für die drei Mutationen negativen Individuen.

Diese Ergebnisse standen im Widerspruch zu den Ergebnissen mit transfizierten Nierenzellen, die eine verringerte Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$, der Vorstufe zur Zytokinproduktion (Abb. 1.3), bei CARD15-mutierten Zellen nach Stimulation mit LPS zeigten. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass LPS in den Monozyten hauptsächlich zu einer potenten Aktivierung des $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Systems durch Bindung an TLR4 in Verbindung mit dem Korezeptor MD2 und mit CD14 an der Zelloberfläche führt (Abb. 4.1). Diese Rezeptoren fehlen bei der embryonalen Nierenzelllinie HEK239. Auch steht diese Beobachtung im Einklang mit späteren Erkenntnissen, dass eigentlich nicht LPS der Stimulus für NOD2 ist, sondern Muramylpeptid, der kleinste pathogene Bestandteil von Peptidoglykan (PGN).

4.2.2 Monozytäre Zytokinproduktion in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp nach MDP-Stimulation

Aufgrund der Erkenntnisse im ersten Teil der Arbeit und der Identifizierung von Muramylpeptid als kleinster pathogener Bestandteil von PGN, welcher durch

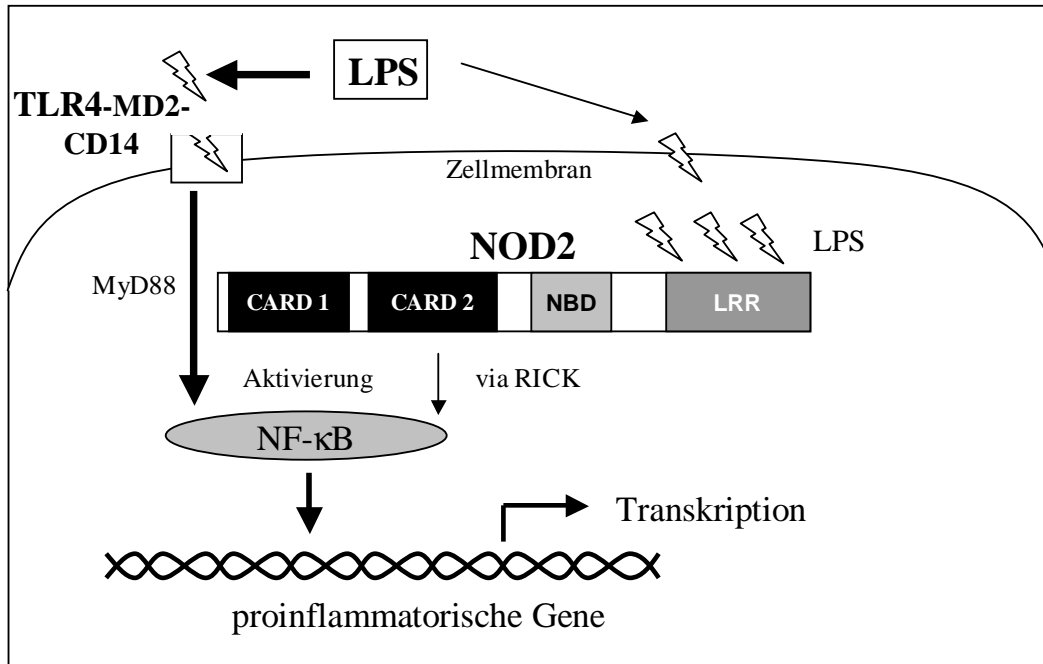


Abb. 4.1: Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Bindung von LPS an den TLR4-MD2-CD14-Komplex

NOD2 erkannt wird und anscheinend keine anderen monozytären Rezeptoren außer NOD2 stimuliert, wurden die Untersuchungen im zweiten Teil der Arbeit mit MDP als spezifischen Stimulus und LPS als Kontrolle für die TLR-Aktivierung wiederholt.

a.) Dabei wurde beobachtet, dass Monozyten mit homozygoter L1007fs-Mutation im CARD15-Gen im Gegensatz zu Monozyten mit zwei Wildtyp-Allelen (Kontrollgruppe und Wildtyp-Patienten) keine signifikant erhöhte TNF α -Sekretion im Überstand nach Stimulation mit MDP zeigen. Diese Ergebnisse entsprechen *in vitro*-Beobachtungen an transfizierten Nierenzellen, welche zeigen, dass in L1007fs-transfizierten embryonalen Nierenzellen keine NF- κ B-Aktivierung nach MDP-Stimulation stattfindet [Ino03b]. Monozyten von heterozygoten Patienten dagegen waren zu einer signifikant erhöhten TNF α -Produktion im Überstand nach MDP-Stimulation fähig [Ino03b]. Damit zeigt sich, dass ein einziges Wildtyp-Allel für die Stimulation der Monozyten zur TNF α -Produktion ausrei-

chend ist. Bei der Stimulation mit LPS zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinsekretion in den einzelnen Populationen, was wiederum aufgrund der Erkenntnisse aus dem ersten Teil der Arbeit zu erwarten war.

b.) Beim Vergleich zwischen den einzelnen Populationen bezüglich der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ergab sich nach MDP-Stimulation ein signifikant höherer Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung in der Kontrollgruppe, Gruppe der Wildtyp- und heterozygoten Patienten als in der Gruppe der L1007fs-Homozygoten. Im Gegensatz dazu besteht kein signifikanter Unterschied in der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Wildtyp-Patienten sowie der heterozygoten Patienten und auch nicht zwischen den Wildtyp-Patienten und den heterozygoten Patienten.

c.) Die Daten für IL10 sind ähnlich, auch wenn nicht so eindeutig. Es kam auch hier auch zu einem signifikanten Anstieg der IL10-Sekretion nach MDP-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Monozyten in Wildtyp- und heterozygoten Monozyten, nicht aber in Monozyten von für die L1007fs-Mutation homozygoten Patienten. Allerdings war dies nicht der Fall bei der LPS-Stimulation. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der L1007fs-Homozygoten und den anderen Populationen, aber auch zwischen den heterozygoten Patienten und der Kontrollgruppe. Dies kann dadurch erklärt werden, dass zum Zeitpunkt der IL10-Messung nach 6 Stunden nicht die maximale IL10-Produktion gemessen wurde, da der maximale IL10-Anstieg zu einem späteren Zeitpunkt stattfindet (siehe auch unten mRNA-Daten).

4.2.3 Vergleich mit mRNA-Daten

Parallel zu dieser Arbeit wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe des chirurgischen Forschungslabors Innenstadt der LMU München Messungen der mRNA-Expression durchgeführt. Dazu wurden die Monozyten nach der MDP-Stimulation lysiert und bei -80°C eingefroren. Dieses Material wurde dann zur Ermitt-

lung der mRNA-Expression in den Zellen weiterverarbeitet, indem die totale zelluläre Expression von $\text{TNF}\alpha$ -mRNA nach 1,5 Stunden bzw. von IL10-mRNA nach 6 Stunden mittels quantitativer Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) gemessen wurde (Dissertation S. Wagner, [Wag04]). Dabei ergab sich eine gute Korrelation zwischen der $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Synthese nach 1,5 Stunden und unseren Ergebnissen auf Proteinebene 6 Stunden nach MDP-Stimulation. Auch hier war die Menge der $\text{TNF}\alpha$ -mRNA nach MDP-Stimulation bei der Kontrollgruppe und der Gruppe der Wildtyp Patienten signifikant höher im Vergleich zu den L1007fs-homozygoten Patienten ($p=0,036$ bzw. $p=0,008$). Dagegen war die Korrelation zwischen der IL10-mRNA-Synthese nach 6 Stunden und unseren Ergebnissen auf Proteinebene nach 6 Stunden nicht hoch. Dies würde sich dadurch erklären lassen, dass die maximale IL10-Sekretion erst zu einem späteren Zeitpunkt (ca. 12 Stunden, siehe auch Zeitkurve Abb. 3.3) stattfindet, da eine maximale mRNA-Expression nach 6 Stunden zu beobachten ist. Dies bestätigt auch das Ergebnis einer signifikant erhöhten IL10-mRNA-Synthese nach 6 Stunden bei der Kontrollgruppe im Vergleich zu den L1007fs-homozygoten Patienten ($p=0,036$), siehe auch Abb. 4.2 [Wag04].

4.2.4 Vergleich mit anderen Literaturdaten

Mittlerweile gibt es auch andere Untersuchungen mit primär isolierten Zellen. So wurde in peripheren Blutmonozyten von zwei Individuen (eine Person klinisch gesund, die andere an M. Crohn erkrankt), die homozygot für die L1007fs-Mutation waren, auch eine fehlende $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nach MDP-Stimulation festgestellt [Ino03b].

Bezüglich der anderen zwei assoziierten Mutationen im CARD15-Gen wurde nur in transfizierten Nierenzellen gezeigt, dass R702W- und G908R-mutierte Zellen zu einer reduzierten, aber nicht fehlenden $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nach Stimulation mit MDP führen [Ino03b]. Unsere Ergebnisse bei compound heterozygoten

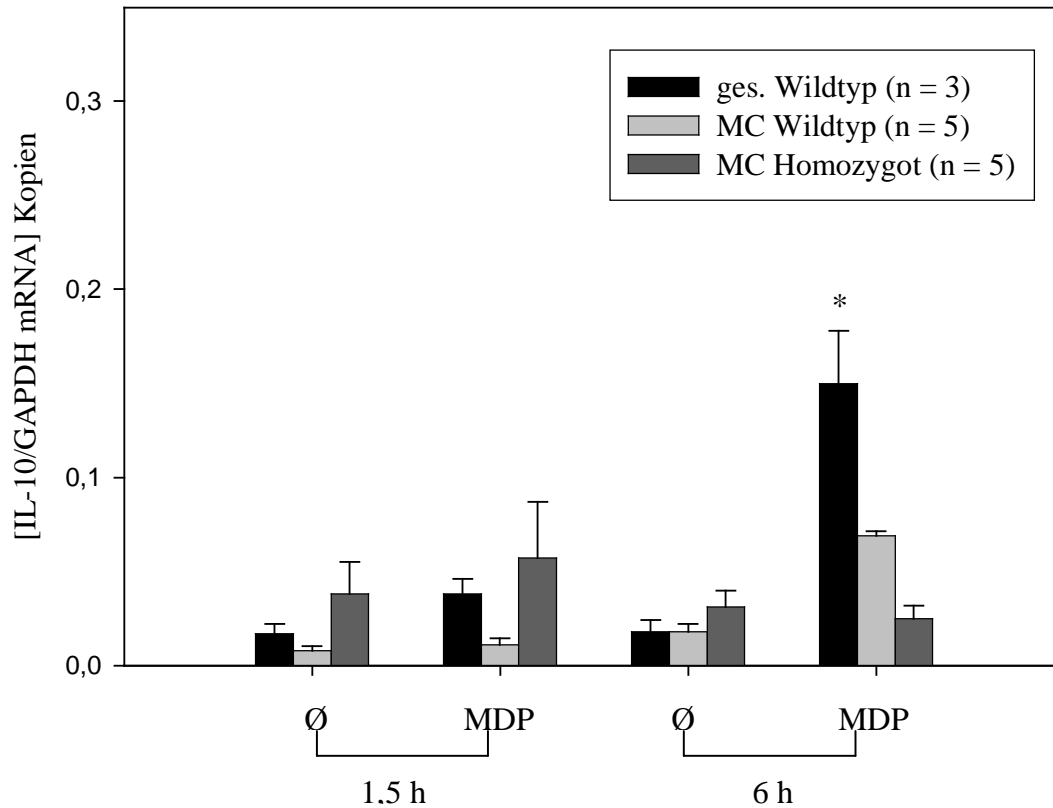


Abb. 4.2: MDP-induzierte Expression von IL10-mRNA je nach CARD15/NOD2 Genotyp. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und nach der gleichen Kulturdauer auf Medium ohne MDP. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP, MC = Morbus Crohn, WT = Wildtyp; Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ zwischen gesunden Probanden mit Wildtyp und L1007fs-homozygoten Patienten. Aus Dissertation S. Wagner.

Patienten stützen diese Beobachtung. In compound heterozygoten Patienten kam es zu einer signifikant niedrigeren $\text{TNF}\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit MDP, jedoch war hier auch ein Effekt zu sehen. Im Gegenteil hierzu wurde bei Monozyten von für die L1007fs-Mutation homozygoten Patienten gar keine Antwort beobachtet.

Zudem gibt es eine Studie mit primären menschlichen mononukleären Zellen, die ein Fehlen einer IL8-Sekretion bei L1007fs-Homozygoten nach Stimulation mit MDP zeigen. Interleukin 8 ist ein wichtiger Aktivator für neutrophile Granulozyten und spielt damit auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese von M. Crohn. Bei R702W- und G908R-mutierten Zellen wurde bei niedrigen Dosen von MDP ebenfalls keine IL8-Produktion festgestellt, allerdings bei höheren Dosen eine geringe Induktion von IL8. Das lässt auf eine unterschiedliche Auswirkung auf die Empfindlichkeit auf MDP der drei mit M. Crohn assoziierten Mutationen schließen [Li04]. In dieser Studie wurde auch die Induktion von IL1 β untersucht, die eine posttranskriptionelle Abhängigkeit des NOD2/CARD15-Pathways für IL1 β nach Stimulation mit MDP und $\text{TNF}\alpha$ zeigt. Bei L1007fs-Homozygoten fand sich nämlich ein Fehlen der IL1 β -Sekretion, aber eine merkliche Induktion von IL1 β -mRNA [Li04].

4.3 Mögliche pathogenetische Erklärungsansätze für die Bedeutung der CARD15-Mutationen

Im Moment herrscht noch Unklarheit über den Zusammenhang zwischen der Nicht-Erkennung von bakteriellen Bestandteilen mit fehlender $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung bei CARD15-Mutationen und der Entstehung von M. Crohn. Wie also führen CARD15-Mutationen zu einer chronischen Entzündung des Darms und welche anderen genetischen Einflüsse oder Umweltfaktoren spielen eine Rolle? Dazu gibt es viele Hypothesen, wobei man „loss of function“ und „gain of functi-

on“-Hypothesen unterscheiden kann. Die folgenden Ansätze werden den „loss of function“-Hypothesen zugeschrieben:

Zum einen könnten die Mutationen aufgrund der Funktion von NOD2 als Rezeptor für pathogene bakterielle Bestandteile zu einer inadäquaten angeborenen Immunantwort führen. So könnte die Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems als Antwort auf intestinale luminale Bakterien derart defekt sein, dass intrazelluläre Bakterien in zu geringem Ausmaß abgetötet werden, so dass dieser protektive Weg vor Pathogenen gestört ist und eine erhöhte Invasion der Bakterien in die Darmschleimhaut zur Folge hätte. Dies wiederum könnte zu einer sekundären kompensatorisch überschießenden Antwort des adaptiven Immunsystems via Effektor-T-Zellen, die kein NOD2 exprimieren und Interleukin 12 und Interferon γ ausschütten, führen [Bou03]. Diese aberrante diffuse Zytokinproduktion wurde unabhängig von NOD2 in intestinalem Gewebe von M. Crohn Patienten gefunden [Ino03b] und resultiert in einer chronischen Entzündung des Darms. Dieses Modell stimmt mit dem beobachteten Gen-Dosis-Effekt der drei NOD2-Mutationen [Ogu01a, Hug01] und dem rezessiven Vererbungsmodell, das für M. Crohn angenommen wird [Orh93], überein. Diese abnorme Adaptation des Darmlumens gegenüber Bakterien, bedingt durch eine Hyporeaktivität des angeborenen mukosalen Immunsystems ist im Sinne einer Immundefizienz und nicht im Sinne eines Verlustes der immunologischen Toleranz zu sehen [Fol03].

Zum anderen exprimieren auch intestinale Epithelzellen (IEC) und Paneth-Zellen — spezialisierte Zellen am Grund der intestinalen Krypten des terminalen Ileums — NOD2. Sie sezernieren Defensine und andere antimikrobielle Peptide als Reaktion auf bakteriellen Kontakt. Daher könnte die fehlende Funktion von NOD2 auch in diesen Zellen zu einer geringeren Sekretion von Chemokinen und Defensinen als Antwort auf bakterielle Produkte führen [Weh04], was eine Proliferation der Bakterien in den Krypten und den Verlust der Barrierefunktion der Mucosa bedingen würde. So wurde gezeigt, dass NOD2 in menschlichen Epithelzellen auch als antibakterieller Faktor fungiert, indem z.B. *Salmonella typhimu-*

rium intrazellulär direkt abgetötet wird, und L1007fs-Mutanten diese Fähigkeit fehlt [His03]. Auch wurde eine schwächere Expression von antibakteriellen Peptiden in Epithelzellen von M. Crohn Patienten mit CARD15-Mutationen beobachtet [Weh04].

Zudem könnte es durch die Mutationen im CARD15-Gen zu einer Modifizierung der Interaktion zwischen der LRR-Region von NOD2 und MDP kommen. Vielleicht ändern diese Mutationen die Spezifität der Liganden von NOD2, so dass andere neue bakterielle Bestandteile neben MDP oder auch körpereigene Moleküle erkannt werden, die die inflammatorische Reaktion fördern [Phi04].

Es könnten auch unterschiedliche Effekte von Wildtyp- und mutiertem CARD15 auf die durch Caspase 9 induzierten Apoptosemechanismen bestehen. NOD2 interagiert mit der CARD-Domäne von Caspase 9 und kann damit nicht direkt, sondern durch die Koexpression mit Caspase 9 eine erhöhte apoptotische Aktivität hervorrufen [Ogu01b]. Daher könnte bei CARD15-Mutanten die Fähigkeit zur Hochregulation der Caspase 9 abhängigen Apoptose verloren gegangen sein. Eine verminderte Apoptose immunkompetenter Zellen wie T-Lymphozyten würde dann zu einer unkontrollierten chronischen Entzündung führen. Für diese Hypothese spricht weiterhin, dass therapeutische Effekte verschiedener Ansätze bei M. Crohn wie Glukokortikoide oder Antikörper gegen $\text{TNF}\alpha$ und IL12 auch durch die Induktion von Apoptose immunkompetenter Zellen erklärt werden können. Dabei ist ein Teil des entzündungshemmenden Effekts von monoklonalen Antikörpern gegen $\text{TNF}\alpha$ durch die Induktion von Apoptose in Monozyten mittels eines Caspase abhängigen Weges erklärbar [Lug01].

Eine „gain of function“-Hypothese beschreibt eine Studie von Watanabe et al. vom Juni 2004. Hier wird eine plausible Erklärung für die Entstehung der chronischen Entzündung bei CARD15-mutierten Allelen beschrieben. Mit Hilfe von Splenozyten CARD15-defizienter Mäuse wurde nachgewiesen, dass normalerweise NOD2 die über TLR2 vermittelte Th1-Antwort auf PGN mit $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung und nachfolgender Zytokinausschüttung verhindert. Die Re-

gulation dieser über TLR2-induzierten Th1-Antwort soll durch eine reduzierte Aktivierung und Translokation von c-Rel, einer Untereinheit von NF- κ B, erfolgen. In Abwesenheit von NOD2, wie z.B. bei den mit M. Crohn assoziierten CARD15-Mutationen, ist die NOD2-vermittelte Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung aufgehoben, was zu einer gesteigerten TLR2-vermittelten NF- κ B-Aktivierung und erhöhter IL12-, IL18- und Interferon γ -Produktion führt. Daher resultieren CARD15-Mutationen in einer gesteigerten Th1-Zytokinproduktion [Wat04]. Diese Hypothese wurde allerdings in neueren Studien nicht bestätigt [Li04].

Mit dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass, wie schon in artifiziellen Systemen gezeigt, auch die Monozyten von M. Crohn Patienten mit homozygoter L1007fs-Mutation im Gegensatz zu Wildtyp-Patienten die Fähigkeit zur NOD2-vermittelten Antwort auf das bakterielle Bestandteil MDP verlieren. Dabei wurden im Gegensatz zu artifiziellen Systemen die Monozyten aus M. Crohn Patienten gewonnen und die Antwort auf Proteinebene verifiziert. Allerdings entspricht auch eine *ex vivo*-Situation nicht ganz einer *in vivo*-Situation im Menschen, so dass auch hier nicht mit letztendlicher Sicherheit von der Realität der Ergebnisse ausgegangen werden kann. Mit den erstellten Daten konnte aber aufgrund der Funktion von NOD2 als Rezeptor für pathogene Bestandteile und deren Funktionsverlust bei mit M. Crohn assoziierten Mutationen zumindest ein anzunehmender Zusammenhang zwischen Mutationen im CARD15 Gen und chronischer Darmentzündung hergestellt werden und ein Beweis für die pathogenetische Wichtigkeit von luminalen Bakterien erbracht werden. Auch stimmt dieses „loss-of-function“ Modell mit den Daten über einen Dosiseffekt überein: Träger der mit M. Crohn assoziierten Mutationen auf beiden Chromosomen, sogenannte Double-Dose-Träger (Homozygote und compound Heterozygote), haben ein größeres Risiko zur Entwicklung der Erkrankung als Personen mit nur einer Mutation. Allerdings wurden auch gesunde Kontrollen unter den homozygoten Trägern gefunden [Les02] und viele M. Crohn Patienten tragen keine Mutation im CARD15-Gen

[Orh00, Tho96, Tys88]. Daher scheinen diese „loss-of-function“ Mutationen im CARD15-Gen weder entscheidend noch notwendig für die Entwicklung von M. Crohn zu sein, so dass noch andere genetische Faktoren so wie Umwelteinflüsse nötig sind.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Morbus Crohn gehört zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, deren Ätiologie noch weitgehend ungeklärt ist. Zur Zeit wird davon ausgegangen, dass eine genetisch bedingte Störung der immunologischen Antwort des angeborenen Immunsystems gegenüber luminalen Antigenen im Darm besteht, was pathophysiologisch zur Aktivierung immunkompetenter Zellen der Darmwand und anschließender überschießender Reaktion mit Ausschüttung von spezifischen Entzündungsmediatoren führt. Als erstes funktionelles Kandidatengen, das in europäischen und amerikanischen Populationen mit M. Crohn assoziiert ist, wurde im Jahre 2001 das NOD2/CARD15 Gen entdeckt. Das CARD15-Gen wird stark in Monozyten exprimiert und besitzt als intrazellulärer cytosolischer Rezeptor die Funktion der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen wie Muramyl-dipeptid (MDP), dem kleinsten pathogenen Bestandteil von Peptidoglykan (PGN). Dadurch wird über die Aktivierung des Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)-Systems eine inflammatorische Antwort mit Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) erzeugt. Als Hauptmutationen, die bei Kaukasiern mit M. Crohn assoziiert sind, wurden drei single nucleotide polymorphismen (SNP) beschrieben: eine frameshift Mutation im Exon 11 (L1007fs) und zwei missense Varianten im Exon 4 und 8 (R702W und G908R). Die L1007fs-Mutation ist die häufigste der mit M. Crohn assoziierten Mutationen und re-

sulziert in einem verkürzten NOD2-Protein. Heterozygote Träger besitzen ein 2–4fach, homozygote oder compound heterozygote Träger ein 20–40fach erhöhtes Risiko, an M. Crohn zu erkranken.

Der Mechanismus, durch welchen die beschriebenen genetischen Varianten des CARD15-Gens zu einer Prädisposition für M. Crohn führen könnten, und ihre funktionelle Bedeutung ist bisher unbekannt. Die ersten Experimente über die funktionelle Bedeutung der CARD15-Mutationen fanden in künstlichen Systemen statt, in welchen Zellen mit verschiedenen Varianten des CARD15-Gens transfiziert wurden. So wurde in transfizierten embryonalen Nierenzellen nachgewiesen, dass die L1007fs-mutierten Zellen die Fähigkeit zur NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit LPS und PGN im Gegensatz zu den CARD15-Wildtyp-Zellen gänzlich verlieren und die R702W- und G908R-mutierten Zellen eine signifikant verringerte NF- κ B-Aktivierung aufweisen. In diesen Modellen sind jedoch eine Überexpression von CARD15 und andere Artefakte der Kultursysteme möglich, die zu veränderten Ergebnissen führen können. Deshalb und aufgrund des Widerspruchs zwischen NF- κ B-Aktivierung *in vitro*, wo es bei den CARD15-Mutanten zu einer verringerten Aktivität von NF- κ B kommt, und *in vivo* mit Überaktivierung des NF- κ B-Systems bei M. Crohn Patienten wurde in dieser Arbeit die Monozytenfunktion an aus Vollblut isolierten Monozyten von M. Crohn Patienten untersucht. Dabei sollte das Verhalten der Monozyten von M. Crohn Patienten, welche Mutationen des CARD15-Gens tragen, mit dem Verhalten der Monozyten von M. Crohn Patienten, die den Wildtyp im CARD15-Gen besitzen, und von gesunden Kontrollpersonen verglichen werden. Um diesen Vergleich zu verifizieren, wurde die Zytokinproduktion der Monozyten im Zellkulturüberstand nach Isolierung, Kultivierung und Stimulation mit LPS oder MDP gemessen. Dafür eigneten sich TNF α als proinflammatorisches Zytokin und IL10 als antiinflammatorisches Zytokin. Hierbei wurde bewusst auf Proteinebene gearbeitet, da in Vorarbeiten meist die mRNA-Ebene untersucht wurde oder die Untersuchungen auf Ebene der NF- κ B-Aktivierung stoppten und der „downstream“-Effekt,

d.h. die Zytokinproduktion, nicht dargestellt wurde. Dies ist aber von außerordentlicher Wichtigkeit, da die Ausschüttung von Zytokinen auf mehreren Stufen streng kontrolliert wird und verschiedenen negativen Feedbackmechanismen unterworfen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es nach Stimulation mit LPS zu keinen signifikanten Unterschieden in der Zytokinproduktion — weder für $\text{TNF}\alpha$ noch für IL10 — bei Monozyten von L1007fs-homozygoten Patienten im Vergleich zu Monozyten von für die drei Mutationen negativen Patienten. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit späteren Beobachtungen, dass eigentlich nicht LPS der Stimulus für NOD2 ist, sondern Muramylpeptid (MDP).

Im Gegensatz zu LPS kommt es nach Stimulation mit MDP bei Monozyten mit homozygoter L1007fs-Mutation im CARD15-Gen im Vergleich zu Monozyten mit zwei Wildtyp-CARD15-Allelen (Kontrollgruppe und Wildtyp-Patienten) zu keiner signifikant erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Sekretion im Überstand. Monozyten von heterozygoten Patienten dagegen waren zu einer signifikant erhöhten $\text{TNF}\alpha$ -Produktion im Überstand nach MDP-Stimulation fähig. Damit zeigt sich, dass ein einziges Wildtyp-Allel für die Stimulation der Monozyten zur $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ausreichend ist. Beim Vergleich zwischen den einzelnen Populationen bezüglich der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion ergab sich nach MDP-Stimulation ein signifikant höherer Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung bei den anderen Populationen (Kontrollgruppe, Wildtyp, heterozygote Patienten) als in der Gruppe der L1007fs-Homozygoten. Im Gegensatz dazu besteht kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anstiegs der $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Wildtyp-Patienten sowie der heterozygoten Patienten und auch nicht zwischen den Wildtyp-Patienten und den heterozygoten Patienten.

Mit dieser Arbeit wurde erstmals nachgewiesen, dass, wie schon in artifiziellen Systemen gezeigt, auch die Monozyten von M. Crohn Patienten mit homozygoter L1007fs-Mutation im Gegensatz zu Wildtyp-Patienten die Fähigkeit zur NOD2-vermittelten Antwort auf MDP verlieren. Dabei wurden im Gegensatz zu artifi-

ziellen Systemen die Monozyten von M. Crohn Patienten gewonnen und die Antwort auf Proteinebene mittels $\text{TNF}\alpha$, nicht auf Ebene der $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung, verifiziert. Mit den erstellten Daten konnte aufgrund der Funktion von NOD2 als Rezeptor für pathogene Bestandteile und deren Funktionsverlust bei mit M. Crohn assoziierten Mutationen ein Zusammenhang zwischen dem angeborenem Immunsystem und chronischer Darmentzündung hergestellt werden und ein Beweis für die pathogenetische Wichtigkeit von luminalen Bakterien erbracht werden. Allerdings wurden auch gesunde Kontrollen unter den homozygoten Trägern gefunden und nicht alle M. Crohn Patienten tragen eine Mutation im CARD15-Gen. Daher scheinen diese „loss-of-function“ Mutationen im CARD15-Gen weder entscheidend noch notwendig für die Entwicklung von M. Crohn zu sein, so dass noch andere genetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse für die Entstehung der Krankheit verantwortlich sind. Schließlich wird NOD2/CARD15 auch nur für etwa 30–40% der genetischen Faktoren bei M. Crohn verantwortlich gemacht.

Anhang A

Abkürzungen

Apaf1	<u>A</u> poptotic <u>p</u> rotease- <u>a</u> ctivating <u>f</u> actor <u>1</u>
APC	<u>A</u> ntigen <u>P</u> resenting <u>C</u> ells
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
CARD	<u>C</u> aspase <u>A</u> ctivation and <u>R</u> ecruitment <u>D</u> omain
CD	<u>C</u> luster of <u>D</u> ifferentiation
CDAI	<u>C</u> rohn's <u>D</u> isease <u>A</u> ctivity <u>I</u> ndex
CED	<u>c</u> hronisch <u>e</u> ntzündliche <u>D</u> armerkrankungen
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacid
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>L</u> inked <u>I</u> mmuno <u>S</u> orbent <u>A</u> ssay
FACS	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orter
Fc	<u>F</u> ragment <u>c</u> rystalline
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum
FITC	<u>F</u> luorescinisothiocyant
HEPES	<u>H</u> ydroxyethylpiperazin-N-2- <u>E</u> thansulfonsäure
HRP	<u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase
LOD	<u>L</u> ogarithm of <u>O</u> dds
IBD	<u>I</u> nflammatory <u>B</u> owel <u>D</u> isease

IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IKK	<u>I</u> kappa <u>B</u> - <u>K</u> inasen
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
LRR	<u>L</u> eucin- <u>R</u> ich <u>R</u> epeats
LTA	<u>L</u> ipoteichon <u>a</u> cid
MACS	<u>M</u> agnetic <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
MDP	<u>M</u> uramyl <u>d</u> i <u>p</u> eptid
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex
NBD	<u>N</u> ucleotide <u>B</u> inding <u>D</u> omain
NF- κ B	<u>N</u> uclear <u>F</u> actor- <u>k</u> appa <u>B</u>
NOD	<u>N</u> ucleotide-binding <u>O</u> ligomerisation <u>D</u> omain
PAMP	<u>P</u> athogen <u>A</u> ssociated <u>M</u> olecular <u>P</u> atterns
PBMC	<u>P</u> eripheral <u>B</u> lood <u>M</u> ononuclear <u>C</u> ells
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PFA	<u>P</u> ara <u>f</u> ormaldehyd
PGN	<u>P</u> eptidoglykan
PRR	<u>P</u> attern <u>R</u> ecognition <u>R</u> eceptor
RFLP	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment- <u>L</u> ängen- <u>P</u> olymorphismus
RMPI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase
SAI	<u>S</u> everity <u>A</u> ctivity <u>I</u> ndex
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
TLR	<u>T</u> oll- <u>L</u> ike <u>R</u> eceptor
TNF α	<u>T</u> umor- <u>N</u> ekrose- <u>F</u> aktor α

Literaturverzeichnis

- [Abr02] Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papdakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:679–688.
- [Adl96] Adler G, *Morbus Crohn - Colitis Ulcerosa*, Springer-Verlag, 2. Auflage 1996
- [Ahm02] Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854–866.
- [And03] Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekbom A. Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:40–46.
- [Ann99] Annese V, Latiano A, Bovio P, Forabosco P, Piepoli A, Lombardi G, Andreoli A, Astegiano M, Gionchetti P, Riegler G, Sturniolo GC, Clementi M, Rappaport E, Fortina P, Devoto M, Gasparini P, Andriulli A. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disea-

- se supports linkage to the IBD1 locus — a GISC study. *Eur J Hum Genet* 1999;7:567–573.
- [Ber99] Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A. Epidemiology of Crohn’s disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study. *Am J Epidemiol* 1999;149:916–924.
- [Brr03] Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. CARD15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn’s disease colon. *Gut* 2003; 52:840–846.
- [Bet99] Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, Tayber OV, Errada PR, Grant JR, Keilty JJ, Gosselin ML, Robison KE, Wong GH, Glucksmann MA, DiStefano PS. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member, that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 1999;274:12955–12958.
- [Bin98] Binder V. Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* 1998;16:351–355.
- [Bon03a] Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nunez G. Crohn’s disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to Lipopolysaccharide and Peptidoglycan. *Gastroenterology* 2003;124:140–146.
- [Bon03b] Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521–536.
- [Bou03] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003;5:521–533.

- [Bra98] Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH. American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology* 1998;115:1056–1061.
- [Bul03] Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Hermon-Taylor J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in fresh ileocolic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2003;41:2915–2923.
- [Cav01] Cavanaugh J; IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet.* 2001; 68:1165–1171.
- [Cha03] Chaimaillard M, Philpott D, Girardin SE et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:3455–3460.
- [Cur98] Curran ME, Lau KF, Hampe J, et al. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosome 12 and 16. *Gastroenterology* 1998;115:1066–1071.
- [Cut02] Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867–874.

- [MLP99] Duale Reihe, Innere Medizin, Hippokrates, 1999
- [Fell04] Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2003;15(6):627-34.
- [Fio98] Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
- [Fol03] Folwaczny C, Glas J, Török HP. Crohn's disease: an immunodeficiency?. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:1-6.
- [Gas98] Gaschè C, Schölmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm. Bowel Dis.* 2000;6:8-15.
- [Gen94] Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-767.
- [Gir02] Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens - common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 2002;10:193-199.
- [Gir03] Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-8872.
- [Gut02] Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of NOD2 in myelomonocytic

- and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2002;277:41701–41705.
- [Ham01] Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insert mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925–1928.
- [Ham02] Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S. Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661–1665.
- [His03] Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:993–1000.
- [Hug96] Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier 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. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996; 379:821–823.
- [Hug99] Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G. Etiology of the inflammatory bowel diseases: *Int J Colorect Dis* 1999;14:2–9
- [Hug01] 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. Association of NOD2

- leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599–603.
- [Hug04] Hugot JP. Inflammatory bowel disease: a complex group of genetic disorders. *Clinical Gastroenterology* 2004;18:451–462.
- [Ino99] Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J et al. NOD1, an Apaf-1 like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* 1999;274:14560–14567.
- [Ino01a] Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human NOD1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* 2001;276:2551–2554.
- [Ino01b] Inohara N, Nunez G. The NOD: a signaling module that regulate apoptosis and host defence against pathogens. *Oncogene* 2001; 20:6473-6481.
- [Ino02] Inohara N, Yasunori O, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:76–80.
- [Ino03a] Inohara N, Nunez G. NODs: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:371–382.
- [Ino03b] Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusomoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;124:140–146.
- [Jan02] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216.

- [Kar00] Karlinger K, Gyorke T, Mako E, Mester A, Tarjan Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Eur J Radiol.* 2000; 35:154–167.
- [Kou96] Koutroubakis I, Manousos ON, Meuwissen SG, Pena AS. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 1996;43:381–393.
- [Lal03] Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47–57.
- [Les02] Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamailard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845–857.
- [Li04] Li J, Moran T, swanson E, Julian C, Harris J, Bonen DK, Hedl M, Nicolae DL, Abraham C, Cho JH. Regulation of IL-1 β expression in Crohns disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human Molecular Genetics* 2004;13:1715–1725.
- [Lin85a] Lind E, Fausa O, Elgjo K, Gjone E. Crohn's disease. Clinical manifestations. *Scand J Gastreterol* 1985;20:665–670.
- [Lin85b] Lind E, Fausa O, Gjone E, Mogensen SB. Crohn's disease. Treatment and outcome. *Scand J Gastroenterol.* 1985;20:1014–8.
- [Lin88] Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G. Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* 1988;29:352–357.

- [Lof02] Loftus jr. EV, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 2002; 31:1–20.
- [Lof04] Loftus EV jr.. Clinical epidemiology of Inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* 2004;126:1504–1517.
- [Lug01] Lügering A, Schmidt M, Lugerling N, Pauels HG, Domschke W, Kucharzik T. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 2001;121:1145–1157.
- [Mak91] Makowiec F, Starlinger M, Jenss H, Jehle E, Becker HD. Prognostic factors in Crohn's disease. Is the probability of a later operation assessable at the initial diagnosis? *Dtsch Med Wochenschr.* 1991;116:961–967.
- [McC01] McCormick P, Manning D. Chronic inflammatory bowel disease and over clean environment: rarity in the Irish traveller community. *Irish Medical Journal* 2001;94:203–204.
- [McG01] McGovern DP, van Heel DA, Ahmad T, Jewell DP. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease. *Gut* 2001;49:752–754.
- [Mur02] Murillo L, Crusius JB, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Pena AS. CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics* 2002;54:59–61.
- [Nau02] Nau GJ, Richmond JF, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002;99:1503–1508.
- [Ogu01a] Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant

- SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603–606.
- [Ogu01b] Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. NOD2, a NOD1/Apaf-1 family member, that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812–4818.
- [Orh91] Orholm M, Munkholm M, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Eng J Med* 1991;324:84–88.
- [Orh93] Orholm M, Iselius L, Sorensen TI, Munkholm P, Langholz E, Binder V. Investigation of inheritance of chronic inflammatory bowel diseases by complex segregation analysis. *BMJ* 1993;306:20–24.
- [Orh00] Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins—results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075–1081.
- [Pee96] Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* 1996; 111:597–603.
- [Phi04] Philpott DJ, Viala J. Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology* 2004;18:555–568.
- [Pod02] Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347:417–429.

- [Rad02] Radlmayr M, Török HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:2091–2092.
- [Ros03] Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:1001–1009.
- [Rot89] Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* 1989; 96:1016–1020.
- [Rus04] Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. Molecular genetics of Crohn's disease. *Science* 2004;14:264–270.
- [Sat96] Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet.* 1996; 14:199–202.
- [Sch98] Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappaB in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998;42:477–484.
- [Shi96] Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690–697.
- [Sil89] Silverstein MD, Lashner BA, Hanauer SB, Evans AA, Kirsner JB. Cigarette smoking in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1989;84:31–33.

- [Sol98] Solomon MJ, Schnitzler M. Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J Surg.* 1998;22:352-358.
- [Tak01] Takeda K, Akira S. Roles of Toll like receptors in innate immune response. *Genes Cells* 2001;6:733-742.
- [Tak03a] Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003a;21:335-376.
- [Tak03b] Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol.* 2003b;5:143-153.
- [Tho96] Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a british twin study. *BMJ* 1996;312:95-96.
- [Tor03] Török HP, Glas J, Lohse P, Folwaczny C. Alterations of the CARD15/NOD2 gene and the impact on management and treatment of Crohn's disease patients. *Dig Dis* 2003;21:339-345.
- [Tor04] Torok HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphism of the Lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin. Immunol.* 2004;112(1): 85-91.
- [Tys88] Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus Myrhed B. Ulcerative Colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. *Gut* 1988;29:990-996.
- [Ver02] Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence,

- genotype–phenotype relationship and haplotype structure. *Am J Hum Genet* 2002;71:74–83.
- [Wag04] Wagner S, Mussack T, Hauser C, Török H, Neth P, Folwaczny C, Jochum M. MDP-induced TNF- α and IL-10 mRNA expression in monocytes of patients with Crohns disease regarding the card 15 genotype. Vortrag, 6th Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis and 5th International Congress on Shock, Munich, 02.-06.03.04. Abstract in: *Shock* 2004; 21(Suppl 1):43
- [Wan00] Wang JE, Jorgensen PF, Ellingsen EA, Almiof M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* 2001;16:178–182.
- [Wat04] Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nature Immunology* 2004;online.
- [Weh04] Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, SchwabM, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohns disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Gut* 2004;53(11):1658-1664.
- [Wol02] Wolfert MA, Murray TF, Boons GJ, Moore JN. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J Biol Chem.* 2002;277:39179–39186.
- [Yan01] Yang SK, Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:260–270.

- [Zah97] Zahler, S., C. Kowalski, A. Brosig, C. Kupatt, B.F. Becker, and E. Gerlach, The function of neutrophils isolated by a magnetic antibody cell separation technique is not altered in comparison to a density gradient centrifugation method. *J Immunol Methods*, 1997. 200: p. 173-9.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Modell zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)	12
1.2	Intron/Exon-Struktur des CARD15-Gens und Struktur des NOD2-Proteins: funktionelle Domänen und Mutationen des CARD15-Gens	18
1.3	Funktion des NOD2-Proteins als cytosolischer Rezeptor für bakterielle Bestandteile	20
3.1	Beispiel für FACS-Analyse	44
3.2	Zeitkurve zur Ermittlung der maximalen Freisetzung von TNF α nach Stimulation mit LPS	45
3.3	Zeitkurve zur Ermittlung der maximalen Freisetzung von IL10 nach Stimulation mit LPS	45
3.4	LPS-induzierte TNF α -Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp	46
3.5	Differenz zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter TNF α -Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen	47
3.6	LPS-induzierte IL10-Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp	48

3.7	Differenz zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter IL10-Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen	49
3.8	MDP- und LPS-induzierte TNF α -Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp	52
3.9	Differenz zwischen unstimulierter und MDP-stimulierter TNF α -Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml MDP bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen	54
3.10	Differenz zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter TNF α -Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen	55
3.11	MDP- und LPS- induzierte IL10-Freisetzung von peripheren Blutmonozyten in Abhängigkeit vom NOD2/CARD15 Genotyp	57
3.12	Differenz zwischen unstimulierter und MDP-stimulierter IL10-Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml MDP bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen	58
3.13	Differenz zwischen unstimulierter und LPS-stimulierter IL10-Freisetzung im Kulturüberstand von Monozyten 6 Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS bei unterschiedlichen NOD2/CARD15 Genotypen	59
4.1	Aktivierung des NF- κ B-Systems durch Bindung von LPS an den TLR4-MD2-CD14-Komplex	64
4.2	MDP-induzierte Expression von IL10-mRNA je nach CARD15/NOD2 Genotyp	67

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Anja Kerstin Mair geb. Schaaf
Geboren:	19. Mai 1975 in Bobingen bei Augsburg
Eltern:	Dr. med. Brigitte Schaaf geb. Wilke, Albert Schaaf
Familienstand:	verheiratet mit Dr. rer. nat. Stephan Mair
Kinder:	Dominik Phillip, geb. 15.09.2006

Schulbildung

1981 – 1985	Grundschule Steppach
1985 – 1994	Humanistisches Gymnasium bei St. Anna, Augsburg
Juli 1994	Abitur, Leistungskurse Biologie und Mathematik

Beruflicher Werdegang

1994 – 1995	Soziales Jahr an der Hessing Klinik Augsburg
1995 – 1998	Ausbildung als Medizinisch technische Laboratoriums- assistentin an der staatlichen Berufsfachschule am Max von Pettenkofer Institut, München
1998 – 1999	Tätigkeit als Medizinisch technische Laboratoriums- assistentin im Notfalllabor der Chirurgischen Klinik der Ludwig–Maximilians–Universität München

Studium

1999 – 2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig–Maximilians–Universität München, Vorklinik
März 2001	Physikum
2001 – 2004	Studium der Humanmedizin an der Ludwig–Maximilians–Universität München, Klinik
März 2002	1. Staatsexamen
März 2004	2. Staatsexamen
2004 – 2005	Praktisches Jahr an der Ludwig–Maximilians–Universität München in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Radiologie.
April 2005	3. Staatsexamen

Beruf

seit August 2005	Assistenzärztin in der Abteilung Innere Medizin des Krankenhauses Weilheim
------------------	--

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Christian Folwaczny danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und dem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit.
- Ganz besonders danke ich meiner Betreuerin Dr. Helga–Paula Török für die stets hilfsbereite, geduldige und immer freundliche Unterstützung in praktischen und theoretischen Fragen und für die gemeinsam erarbeitete Auswahl der Methodik.
- Ebenso gedankt sei Nicole Friedrich für die Ratschläge bei der technischen Durchführung der Experimente sowie für die Hilfe bei der Anwendung und Auswertung der Durchflusszytometrie.
- Nicht zuletzt sei den Patienten und den freiwilligen Probanden gedankt, ohne deren Einverständnis diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Meinem Mann bin ich sehr dankbar für die technische Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts sowie für die moralische Unterstützung.