

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Klinikum Innenstadt  
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf E. Mutschler

**MDP induzierte Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10  
mRNA in Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn  
in Abhängigkeit vom CARD15 Genotyp**

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

vorgelegt von  
Stefanie Wagner  
aus  
München  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. T. Mussack

Mitberichterstatter: PD Dr. med. V. Gülberg  
PD Dr. med. M. Rentsch

Promovierter Betreuer: Dr. med. H. Török

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2008

*Meiner Schwester*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>10</b>
1.1 MORBUS CROHN – ALLGEMEINES.....	10
1.1.1 <i>Epidemiologie.....</i>	<i>10</i>
1.1.2 <i>Krankheitsbild und Therapie.....</i>	<i>11</i>
1.2 MORBUS CROHN – ÄTIOPATHOGENESE.....	16
1.2.1 <i>Umwelteinflüsse – bakterielle Darmflora.....</i>	<i>16</i>
1.2.2 <i>Rolle des mukosalen Immunsystems.....</i>	<i>18</i>
1.2.3 <i>Genetische Faktoren.....</i>	<i>19</i>
1.3 DER NOD2/CARD15-REZEPTOR BEI MORBUS CROHN.....	21
1.3.1 <i>Allgemeines.....</i>	<i>21</i>
1.3.2 <i>Funktion des CARD15-Proteins.....</i>	<i>22</i>
1.3.3 <i>Bakterielle Bestandteile und ihre Rezeptoren.....</i>	<i>23</i>
1.3.4 <i>Crohn-assoziierte Mutationen im CARD15-Gen.....</i>	<i>24</i>
1.3.5 <i>CARD15-Genotyp und Morbus Crohn Phänotyp.....</i>	<i>25</i>
1.3.6 <i>Rolle von TNF-<math>\alpha</math> und IL-10.....</i>	<i>25</i>
1.4 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....	27
<b>2 PATIENTEN UND MATERIAL.....</b>	<b>30</b>
2.1 STUDIENPOPULATION.....	30
2.2 KITS UND CHEMIKALIEN.....	32
2.3 GERÄTE.....	35
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>36</b>
3.1 VORVERSUCHE.....	36
3.1.1 <i>Methodenauswahl zur Monozytenisolation.....</i>	<i>36</i>
3.1.2 <i>Erstellen einer Zeitkurve.....</i>	<i>37</i>
3.1.3 <i>Validierung der total RNA-Menge.....</i>	<i>38</i>
3.1.4 <i>Auswahl des house-keeping-gene.....</i>	<i>38</i>
3.2 HAUPTVERSUCHE.....	39
3.2.1 <i>Isolierung von Monozyten mittels MACS.....</i>	<i>39</i>
3.2.2 <i>Zellkultur und Stimulationsprotokoll.....</i>	<i>40</i>
3.2.3 <i>Isolierung von total RNA aus Monozyten.....</i>	<i>41</i>
3.2.4 <i>cDNA Synthese/reverse Transkription.....</i>	<i>41</i>
3.2.5 <i>RT-PCR/Light Cycler.....</i>	<i>42</i>
3.2.6 <i>Agarose Gelelektrophorese.....</i>	<i>45</i>
3.3 KLINISCHE AUSWERTUNG.....	46
3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	47
<b>4 ERGEBNISSE.....</b>	<b>48</b>
4.1 STUDIENPOPULATION – KLINIK.....	48
4.2 VORVERSUCHE.....	51
4.2.1 <i>Etablierung der Stimulation.....</i>	<i>51</i>
4.2.2 <i>GAPDH als house-keeping-gene.....</i>	<i>54</i>
4.3 HAUPTVERSUCHE.....	55
4.3.1 <i>Vorbemerkungen.....</i>	<i>55</i>
4.3.2 <i>Validität und Spezifität der PCR.....</i>	<i>55</i>
4.3.3 <i>Gelelektrophorese.....</i>	<i>57</i>
4.3.4 <i>MDP-induzierte TNF-<math>\alpha</math> mRNA-Expression bei Wildtyp im CARD15 Gen.....</i>	<i>58</i>
4.3.5 <i>MDP-induzierte TNF-<math>\alpha</math> mRNA-Expression bei homozygoter 3020insC-Mutation im CARD15 Gen.....</i>	<i>60</i>
4.3.6 <i>MDP-induzierte IL-10 mRNA-Expression bei Wildtyp im CARD15 Gen.....</i>	<i>61</i>
4.3.7 <i>MDP-induzierte IL-10 mRNA – Expression bei homozygoter 3020insC-Mutation im CARD15 Gen.....</i>	<i>63</i>
4.3.8 <i>MDP-induzierte TNF-<math>\alpha</math> mRNA-Expression in Abhängigkeit des CARD15 Genotyps.....</i>	<i>65</i>
4.3.9 <i>MDP-induzierte IL-10 mRNA-Expression in Abhängigkeit des CARD15 Genotyps.....</i>	<i>66</i>
4.4 PHÄNOTYP – GENOTYP.....	68

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>70</b>
5.1	DISKUSSION VON STUDIENDESIGN UND METHODEN .....	72
5.2	CARD15-ABHÄNGIGE MDP INDUZIERTER EXPRESSION VON TNF- $\alpha$ UND IL-10 .....	77
5.2.1	<i>Verstärkte MDP-induzierte mRNA-Expression von TNF-<math>\alpha</math> bei Wildtyp</i> .....	77
5.2.2	<i>Verstärkte MDP-induzierte mRNA-Expression von IL-10 bei Wildtyp</i> .....	77
5.2.3	<i>Verminderte MDP-induzierte mRNA-Expression von TNF-<math>\alpha</math> und IL-10 in 3020insC homozygoten Patienten mit Morbus Crohn</i> .....	78
5.2.4	<i>Diskussion der eigenen Ergebnisse mit gegenwärtiger Literatur</i> .....	78
5.2.5	<i>Beurteilung der Ergebnisse in Bezug auf mögliche pathogenetische Zusammenhänge</i> .....	81
5.3	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK .....	85
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>88</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>94</b>
	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>99</b>
	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>100</b>

## **Abkürzungen**

BSA: Albumin Bovine Fraction V Solution  
CARD: Caspase Recruitment Domain  
CDAI: Crohn's Disease Activity Index  
CED: Chronisch-Entzündliche Darmerkrankungen  
CRP: C-Reaktives Protein  
DLG: Discs, Large Homolog  
DNA: Desoxyribonucleic Acid  
EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure  
ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
FACS: Fluoreszenz-Activated Cell Sorting  
FBS: Fetal Bovine Serum  
GAPDH: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase  
HLA: Human Leucocyte Antigen  
IBD: Inflammatory Bowel Disease  
IKK: I $\kappa$ B-Kinase  
IL-10: Interleukin 10  
LPS: Lipopolysaccharid  
LRR: Leucin-Rich Repeats  
MACS: Magnetic Activated Cell Sorting  
MDP: Muramyl-dipeptid  
MHC: Major Histocompatibility Complex  
mRNA: Messenger Ribonucleic Acid  
NBD: Nucleotid-Binding Domain  
NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor  $\kappa$ B  
NOD: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain  
OCTN: Organic Cation Transporter  
PAMP: Pathogen-Associated Molecular Pattern  
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PGN: Peptidoglycan  
PRR: Pattern-Recognition Receptor  
RFLP: Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus  
RICK: Regulatory Protein Kinase

RNA: Ribonucleic Acid

TLR: Toll Like Receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Crohn – Allgemeines

Der Morbus Crohn, benannt nach seinem Erstbeschreiber Burbill B. Crohn 1932, zählt zusammen mit der Colitis ulcerosa und mit nicht klassifizierbaren Formen zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (13). Hierbei handelt es sich um chronisch rezidivierende, in Schüben verlaufende entzündliche Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes.

Der Morbus Crohn, der oft mit signifikanten Einbußen der Lebensqualität einhergeht (10), betrifft vorwiegend Patientinnen und Patienten jüngeren Alters, Ätiologie und Pathogenese sind weitgehend unbekannt. In einem multifaktoriellen Ansatz werden genetische Faktoren, Umweltfaktoren und eine immunologische Fehlregulation diskutiert. Mit zunehmendem Verständnis der Pathomechanismen könnten sich neue Therapiemöglichkeiten ergeben. Eine kausale Therapie ist noch nicht absehbar (69).

### 1.1.1 Epidemiologie

Der Morbus Crohn stellt vor allem in den westlichen Industriestaaten, zunehmend aber auch in den Entwicklungsländern, eine wichtige Morbiditätsursache dar. Die Häufigkeit zeigt geographische und ethnische Unterschiede.

Nordamerikanische und europäische Studien zeigen Inzidenzraten zwischen 3,1 und 14,6/100 000 in Nordamerika und zwischen 0,7 und 9,8/100 000 in Europa. Nach einem starken Anstieg der Inzidenz zwischen dem Zweiten Weltkrieg und Beginn der siebziger Jahre hat sie sich heute auf einem hohen Level stabilisiert. Die Prävalenz liegt in Nordamerika zwischen 26 und 198,5/100 000 und zwischen 8,3 und 214/100 000 in Europa. Sowohl in Nordamerika als auch in Europa ist ein Nord-Süd-Gefälle beim Auftreten von Morbus Crohn zu beobachten. Die größte bisher dokumentierte Inzidenz



und Prävalenz findet sich in Nordamerika, Skandinavien und Großbritannien (53). In Entwicklungsländern wie Asien, Afrika und Lateinamerika sind die Inzidenz- und Prävalenzraten zwar deutlich geringer, aber auch hier lässt sich in den letzten Jahren ein deutlicher Anstieg feststellen (100). Dies könnte auf die zunehmende Verwestlichung des Lebensstils zurückzuführen sein. Neben geographischen können beim Auftreten von Morbus Crohn auch ethnische Unterschiede beobachtet werden. Israelische Juden beispielsweise haben im Vergleich zu nicht jüdischen Kaukasiern eine 2-4fach erhöhte Inzidenz. Asiaten und Araber scheinen seltener an einem Morbus Crohn zu erkranken. Studien über Migranten, bei denen sich die Inzidenzraten an die des Immigrationslandes angleichen, lassen jedoch eher Umweltfaktoren als Ursache dieser Unterschiede vermuten (53).

Die Diagnose eines Morbus Crohn wird meist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr gestellt. Ein späterer, deutlich kleinerer Altersgipfel ist zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr zu erkennen. In den meisten Studien finden sich geringfügig mehr erkrankte Frauen als Männer (53).

### **1.1.2 Krankheitsbild und Therapie**

**Klinische Charakteristika** des Morbus Crohn sind rezidivierende, kolikartige Bauchschmerzen, die oft im rechten Unterbauch lokalisiert sind und chronische, meist nicht blutige Diarrhöen in unterschiedlicher Häufigkeit. Darüber hinaus können unspezifische Symptome wie starker Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Abgeschlagenheit vorhanden sein. Eine Leukozytose, Fieber und Anämie können den Krankheitsschub begleiten. An Komplikationen können im Gastrointestinaltrakt Fisteln in benachbarte Organe (40-50 % der Patienten), Stenosen (30-50 %), anorektale Abszesse (25 %), Perforationen, lebensbedrohliche Blutungen (1-2 %) oder – selten – ein toxisches Megakolon auftreten. Insgesamt erzwingen akute Komplikationen bei 70 % der Patienten innerhalb eines Krankheitsverlaufes von 15 Jahren eine chirurgische Inter-

vention (78). Extraintestinale Manifestationen (Tabelle 1.1), kommen bei 25-35 % der Erkrankten vor (78). Bisweilen dominieren sie. Auf diese Weise kann die zugrunde liegende Darmerkrankung übersehen werden (9, 57).

**Lokalisation:** Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa, die durch einen ausschließlichen Befall des Kolons gekennzeichnet ist, kann der Morbus Crohn den gesamten Gastrointestinaltrakt betreffen. Der Morbus Crohn ist durch einen segmentalen, diskontinuierlichen Befall des Verdauungssystems charakterisiert, der vom Mund bis zum Anus reichen kann. Die häufigsten Lokalisationen betreffen das terminale Ileum und das proximale Kolon: Ein isolierter Ileumbefall wird bei 30 % der Patienten beobachtet, ein isolierter Kolonbefall bei 25 % und ein kombinierter Befall beider Abschnitte bei 45 %. Es können alle Darmschichten befallen sein. Man spricht dann von einem transmuralen Befallsmuster (48).

**Verlauf:** Die Krankheit verläuft bei 80 % der Patienten schubweise mit einer Rezidivhäufigkeit von 30 % nach einem Jahr und 40 % nach zwei Jahren. Bei etwa 20 % der Patienten liegt ein chronisch aktiver Verlauf vor. Zur Beurteilung der Aktivität eines Schubes eignen sich Aktivitätsindices, wie z.B. der „*Crohn's disease activity index*“ (CDAI) nach *Best* (Anhang: Abbildung 8.1), wodurch eine Einteilung in Remission (CDAI < 150), sowie milden, mittleren, schweren und fulminanten (CDAI > 450) Verlauf möglich ist (78). Eine systematische Einteilung bezüglich Lokalisation, Verlauf, Erstmanifestationsalter sowie weiterer Eigenschaften wie Geschlecht, ethnischer Herkunft und Familienanamnese wurde durch die Vienna-Klassifikation vorgenommen (27).

**Tabelle 1.1:**

systemische extraintestinale Manifestationen (78)

<b>LOKALISATION (Häufigkeit)</b>	<b>MANIFESTATION</b>
Gelenke (20-40 %)	Arthralgie, Arthritis, ankylosierende Spondylitis
Leber (9-16 %)	sklerosierende Cholangitis, histologisch portale Hepatitis, Gallensteine, granulomatöse Entzündung
Augen (5-15 %)	Konjunktivitis, Iritis, Uveitis
Haut, Schleimhaut (5-10 %)	Erythema nodosum, Pyoderma gangränosum aphtöse Stomatitis, nahrungsbedingte Dermatosen
Knochen	Osteopenie, aseptische Nekrose
Niere	Albuminurie, Glomerulonephritis
Blut	autoimmunhämolytische Anämie
Gefäße, Herz	Vaskulitiden
Stoffwechsel, Ernährung	Gewichtsverlust, Wachstumsretardierung, Elektrolytmangel, Hypoalbuminämie; Eisen-, Vitamin D-, Folsäuremangelanämie

Die **Diagnose** eines Morbus Crohn wird auf Grund eines klinischen Verdachts durch Labortests, radiologische, endoskopische und histologische Untersuchungen gesichert.

An *Labortests* werden Blutuntersuchungen mit Differentialblutbild und Entzündungsparametern (Blutsenkungsgeschwindigkeit, C-reaktives Protein / CRP) sowie eine Stuhluntersuchung auf pathogene Keime zum Ausschluss einer intestinalen Infektion durchgeführt.

An *bildgebenden Verfahren* spielen das Röntgen des Dünndarms (Fissuren, Pflastersteinrelief, Darmstenosen) und das Hydro-MRT (Darstellung einer verdickten Darmwand, vergrößerter Lymphknoten und perianaler Fisteln) eine Rolle.

Die *Endoskopie* mit Entnahme von *Biopsien* hat in der Diagnostik und Überwachung des Morbus Crohn einen hohen Stellenwert. Die Merkmale für einen Morbus Crohn sind ein diskontinuierlicher Befall aller Wandschichten mit aphtoiden Läsionen, scharf begrenzten Ulzera, Strikturen und Pflastersteinrelief. Die Darmwand kann ödematös und fibrotisch verdickt sein und segmentale Stenosen oder Fisteln ausbilden (99). Die relativ neue diagnostische Möglichkeit der Kapsel-Endoskopie, bei der eine Mikrokamera geschluckt wird, und die Daten nach Darmpassage ausgewertet werden, ist beim Morbus Crohn insbesondere bei Verdachtsfällen, zur Untersuchung der Ausdehnung im Dünndarm und für Therapie-Studien geeignet (41).

*Histologisch* zeigt sich eine ulzeröse Entzündung mit Fissuren und einem transmuralen entzündlichen Filtrat aus Lymphfollikeln und Epitheloidzellgranulomen (99).

**Therapie:** Morbus Crohn ist noch nicht kausal therapierbar. Indikation für eine Therapie sind Symptome mit Krankheitswert, Komplikationen, Mangelerscheinungen, extraintestinale Manifestationen und die Rezidivprophylaxe. Ziel ist eine symptomatische Therapie der Entzündung und der Komplikationen, eine Milderung der Beschwerden sowie die sekundäre Prävention. Die Therapie ist abhängig von Lokalisation und Intensität der Erkrankung (37).

Bereits die alleinige *Ernährungstherapie* (ballaststoffarme Kost, individuelle Diät) besitzt einen antiinflammatorischen Effekt und kann einen Übergang in die Remission bewirken (26).

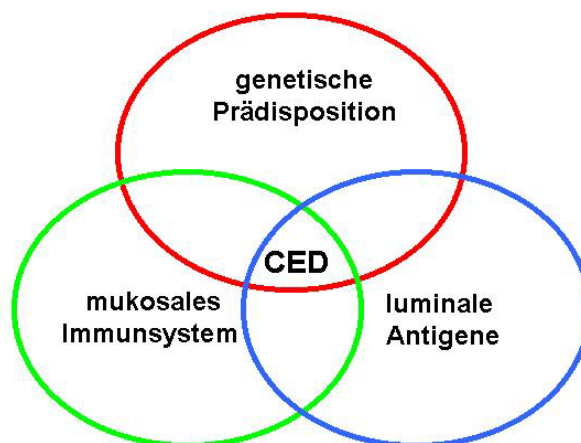
Die *medikamentöse Therapie* nutzt 5-Aminosalicylate (5-ASA), die als Monotherapie zur Rezidivprophylaxe und gemeinsam mit Glukokortikoiden zur Behandlung des milden bis mittelstarken Schubes eingesetzt werden. Bei schweren und fulminanten Schü-

ben kommen neben lokal oder systemisch verabreichten Glukokortikoiden auch Immunsuppressiva (Azathioprin, Methotrexat), Immunmodulatoren (TNF- $\alpha$ -Antikörper) und Antibiotika (z.B. Metronidazol) zum Einsatz. Bei 10-20 % ist ein Absetzen der Steroide aufgrund eines chronisch aktiven Verlaufs nicht möglich und somit ein Remissionserhalt durch Dauertherapie mit Glukokortikoiden und Immunsuppressiva erforderlich (37). Zur Rezidivprophylaxe werden in der modernen Crohn-Therapie vermehrt auch sogenannte Probiotika eingesetzt (77).

Grundsatz der *chirurgischen Therapie* ist eine frühzeitige Planung des gemeinsamen internistischen und chirurgischen Vorgehens. Auch chirurgisch ist Morbus Crohn nicht heilbar, Rezidive werden nicht verhindert. Dennoch müssen 50-80 % der Patienten einmal, etwa 20 % zweimal oder öfter operiert werden. Die Indikation ist streng zu stellen. Rezidivierende Fisteln stellen mit 60 % die häufigste OP-Indikation dar. Des Weiteren ist eine OP-Indikation bei akuten Komplikationen wie Perforation, Peritonitis, Ileus, Blutung oder Stenose sowie bei anorektalen Abszessen gegeben. Dabei gilt das Prinzip der darmerhaltenden „*minimal surgery*“. Eine Proktokolektomie ist selten indiziert und führt immer zu einer endgültigen Stoma-Anlage (78).

## 1.2 Morbus Crohn – Ätiopathogenese

Die Ätiologie des Morbus Crohn ist weiterhin nicht eindeutig, vielmehr scheint eine bestimmte Konstellation verschiedener exogener und endogener Einflüsse das Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zu bedingen. Dabei spielt neben genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen das mukosale Immunsystem offensichtlich eine entscheidende Rolle (Abbildung 1.1). Mit Entdeckung der Assoziation von NOD2/CARD15-Genmutationen und Morbus Crohn gelang ein Durchbruch im Verständnis dieser Erkrankung. Dadurch rückte nicht nur die genetische Ätiologie in den Vordergrund, sondern es konnte auch ein entscheidender Zusammenhang zwischen erblichen Faktoren und Antigenen im Darmlumen dargelegt werden.



**Abbildung 1.1.**

Modell zur Ätiopathogenese des Morbus Crohn

Das aktuelle Modell der Ätiopathogenese von Morbus Crohn wird im Folgenden dargestellt.

### 1.2.1 Umwelteinflüsse – bakterielle Darmflora

Die Tatsache, dass die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen mit 42-58 % (33, 86, 89) unter 100 % liegt und dass sich die Inzidenzraten von für Morbus Crohn prädisponierten Migranten an die des Immigrationslandes angleichen (53), lassen auf

einen starken Einfluss von Umweltfaktoren auf das Erkrankungsrisiko schließen. Ihnen scheint ein Einfluss auf die Darmmukosa bzw. auf die Darmflora gemeinsam zu sein.

Als einzig eindeutig nachgewiesener Risikofaktor wurde das Rauchen festgestellt (89). Weiter scheinen ein erhöhter Hygienestatus während der Kindheit und fehlendes Stillen Risikofaktoren für die Entwicklung eines Morbus Crohn zu sein. Letzteres ist immunologisch interessant, da die Muttermilch neben Antikörpern auch antiinflammatorisch aktive Zytokine enthält. Auch die Ernährung scheint einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu haben. Nahrungsantigene wirken wahrscheinlich entweder direkt auf das mukosale Immunsystem ein oder sie modulieren die Darmflora (79). Eine fett- und kohlenhydratreiche aber ballaststoffarme Ernährung wird für das gehäufte Aufkommen der Erkrankung in den Industriestaaten verantwortlich gemacht (61). Ein Anstieg der Inzidenzraten von Morbus Crohn mit zunehmender Verbreitung des Kühlschranks hängt wohl mit einem damit verbundenen vermehrten Konsum von Fleisch zusammen. In Kühlschränken vermögen auch Mikroorganismen wie *Yersinien* zu überleben, die bei chronischer Infektion zu einem Morbus Crohn führen könnten (39).

Allgemein kann gesagt werden, dass die wichtigste Folge von Umweltfaktoren die veränderte bakterielle Darmflora ist. Ein spezifisches pathogenes Bakterium ist bislang außer kontroversen Hinweisen auf einen Zusammenhang zwischen dem Paratuberkulose-Erreger *mycobacterium avium* und Morbus Crohn (28, 59) nicht bekannt. Grundsätzlich sprechen aber zahlreiche Untersuchungen für eine Beteiligung von Keimen am Krankheitsprozess des Morbus Crohn. Schon die bevorzugte Lokalisation des Morbus Crohn im terminalen Ileum und proximalen Kolon, beides „bakterienfreundliche“ Darmabschnitte mit besonders hohen Bakterienkonzentrationen, könnten auf Keime als Mitverursacher hinweisen (82). Vor allem eine Veränderung in der Zusammensetzung der Darmflora, eine insgesamt erhöhte Bakteriendichte im Darm und ein vermehrtes Eindringen von Bakterien in die Darmmukosa scheinen eine Rolle zu

spielen (84). In Tierversuchen, in denen die Tiere unter sterilen Bedingungen aufgezogen wurden, konnte eine Colitis verhindert werden (19). Für die Bedeutung bakterieller Antigene in der Pathogenese des Morbus Crohn sprechen auch die Inaktivität der Erkrankung in operativ ausgeschalteten Darmarealen und das Auftreten von Rezidiven nach Wiederherstellung der Darmpassage (15). Schließlich bekräftigt der Erfolg von Antibiotika und Probiotika in der Behandlung und Prophylaxe des Morbus Crohn diese Untersuchungen (77).

Der Einfluss der Darmflora auf Morbus Crohn beruht wahrscheinlich auf einer durch bakterielle Antigene induzierten T-Zell-Aktivierung, die eine überschießende Produktion von Zytokinen mit Aktivierung des mukosalen Immunsystems verursacht und schließlich zu einer Destruktion des Darmgewebes führt (17). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit Morbus Crohn die physiologische Toleranz des mukosalen Immunsystems gegenüber der physiologischen Darmflora gestört ist, und somit Immunreaktionen mit fortdauernder inflammatorischer Aktivität bestehen, die ihrerseits eine Destruktion des Darmgewebes verursachen (16, 38).

### **1.2.2 Rolle des mukosalen Immunsystems**

Die physiologische Funktion des Intestinalsystems beruht darin, essentielle Nährstoffe und Wasser zu absorbieren und unbrauchbare Stoffe auszuscheiden. Dabei muss es zwischen harmlosen Antigenen der Nahrungsmittel und infektiösen oder toxischen Antigenen unterscheiden. Zum Schutz vor den letztgenannten besitzt der Intestinaltrakt eine effektive Barriere. Zusätzlich sind sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beteiligt.

Die **effektive Barriere** zeichnet sich durch ein intaktes Darmepithel, den darauf befindlichen Schleim, die Sekretion verschiedener protektiver Faktoren und eine normale Peristaltik aus.



Das **angeborene Immunsystem**, das die erste Antwort auf Fremdartige vermittelt, setzt sich aus Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und dem Komplementsystem zusammen (58). Es wird durch die spezifische Erkennung von Antigenen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) aktiviert. Diese Erkennung geschieht über spezifische Rezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) (30).

Das **erworbene Immunsystem** umfasst B- und T-Lymphozyten und deren Produktion von Immunglobulinen. Es überträgt die spezifische Immunität (58).

Als eine Besonderheit gegenüber anderen immunologischen Vorgängen im menschlichen Körper spielt beim Immunsystem des Darms das Vorhandensein einer Immuntoleranz gegenüber bestimmten Nahrungs- und Bakterienbestandteilen eine essentielle Rolle. Um eine immunologische Aktivität gegenüber nichtschädlichen Bestandteilen zu vermeiden, befindet sich das intestinale Immunsystem in einer physiologischen Hyporeaktivität, die sich zum Beispiel in einer herabgesetzten Aktivierbarkeit und Proliferation von T-Zellen zeigt (85).

Diese Toleranz gefährdet die Abwehrfunktionen nicht, da im intakten Darm ein ausgeglichener Gleichgewichtszustand zwischen proinflammatorischer und antiinflammatorischer Aktivität des intestinalen Immunsystems besteht (38).

Bei Patienten mit Morbus Crohn ist dieser Gleichgewichtszustand erheblich gestört (16). Durch diese Fehlregulation mit proinflammatorischer Überaktivierung des intestinalen Immunsystems und gleichzeitig fehlender antiinflammatorischer Gegenregulation scheint es zur manifesten chronischen Entzündung des Darms im Sinne des Morbus Crohn zu kommen (16, 17).

### 1.2.3 Genetische Faktoren

Schon lange weisen umfassende Studien auf einen signifikanten Einfluss genetischer Faktoren auf die Pathogenese des Morbus Crohn hin. Bestimmte ethnische Gruppen wie z.B. jüdische Kaukasier sind überzufällig häufig an Morbus Crohn erkrankt (53). Aus

epidemiologischen Studien geht eine familiäre Häufung beim Auftreten von Morbus Crohn hervor: Bei 5-10 % aller Betroffenen findet sich eine positive Familienanamnese für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (22). Das relative Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken, ist für Verwandte ersten Grades im Vergleich zur gesunden Bevölkerung etwa 15fach erhöht (65, 68). Bestimmte Krankheitscharakteristika wie intestinale Lokalisation, Alter bei Erkrankung oder das Auftreten von Komplikationen sind bei Patienten mit positiver Familienanamnese überzufällig häufig konkordant (1, 3, 34, 68).

Am anschaulichsten kann der genetische Einfluss auf die Morbus Crohn-Erkrankung anhand von Zwillingsstudien belegt werden. So liegt die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen bei 42-58 %, während sie bei dizygoten Zwillingen nicht signifikant erhöht ist (33, 86, 89).

Ein Mendelscher Erbgang wurde auch bei der Untersuchung großer Familien nicht nachgewiesen (46, 64), so dass eine größere Zahl verschiedener Gene an der Pathogenese beteiligt zu sein scheint. Durch Genomanalysen konnten bisher mehrere chromosomale Regionen gefunden werden, auf denen offenbar Risikogene für die Entwicklung eines Morbus Crohn liegen (7). Das erste Gen, das eindeutig mit dem Auftreten von Morbus Crohn assoziiert ist, ist NOD2/CARD15 auf Chromosom 16. Seitdem wurden weitere Kopplungsregionen gefunden, die Hinweise auf Crohn-assoziierte Genmutationen gaben. Unter anderem sind dies DLG5, OCTN1 und 2, NOD1, HLA und TLR4. Die bedeutendste Rolle nimmt jedoch weiterhin der Genort NOD2/CARD15 ein (93).

### 1.3 Der NOD2/CARD15-Rezeptor bei Morbus Crohn

Im Mai 2001 wurde von zwei unabhängigen Forscherteams ein Zusammenhang zwischen Mutationen im NOD2 Gen, das später in CARD15<sup>1</sup> umnominiert wurde, und dem Auftreten von Morbus Crohn hergestellt (40, 62). Dieses Gen wurde als erstes eindeutig mit der Erkrankung des Morbus Crohn assoziiert. Dies wurde von zahlreichen unabhängigen Studien bestätigt (Zusammenfassung in (87)).

#### 1.3.1 Allgemeines

CARD15 gehört in die Familie der *Nucleotide-Binding Oligomerization Domain / Apoptotic Protease Activating Factor 1* (NOD1/Apaf-1) und wird hauptsächlich aber nicht ausschließlich von Monozyten exprimiert (Tabelle 1.2). CARD15 enthält 12 codierende Exons und liegt in der perizentrometrischen Region des Chromosom 16. Diese Region, genannt *inflammatory bowel disease locus 1*, stellt die Kopplungsregion mit der höchsten Prädisposition für Morbus Crohn dar.

**Tabelle 1.2:**

Zellen mit CARD15-Expression

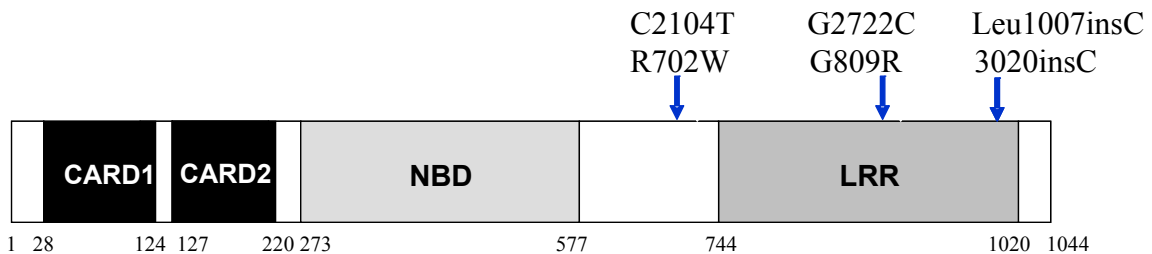
Expression von CARD15	Literatur
Monozyten	(63)
Granulozyten	(32)
Intestinalepithel	(5, 32, 36)
Paneth Körner Zellen	(47, 97)

Das Gen codiert für ein Protein, das wie die meisten Proteine aus der NOD-Familie drei funktionelle Domänen enthält: eine zentral lokalisierte Nukleotid-bindende Domäne

---

<sup>1</sup> Die Bezeichnung CARD15 steht im Folgenden für das CARD15/NOD2-Gen. Das gleichnamige Protein wird als CARD15-Protein bezeichnet.

(NBD), eine aminoterminaler Effektor-bindende Domäne unterteilt in zwei *caspase recruitment domains* (CARD1, CARD2) und eine Carboxy-terminale Liganden-Erkennungs-Domäne mit leucinreichen Wiederholungen (LRR) (Abbildung 1.2) (63).



**Abbildung 1.2:**

Struktur des CARD15-Proteins und Mutationen, modifiziert nach (40, 62).

### 1.3.2 Funktion des CARD15-Proteins

Verschiedene Funktionsuntersuchungen konnten zeigen, dass das CARD15-Protein als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile fungiert und zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems mit Transkription von regulatorischen Genen führt (62, 63).

Die Rezeptorfunktion ähnelt der von Toll-like-Rezeptoren (TLR). Diese membranständigen Rezeptoren erkennen bakterielle Bestandteile und aktivieren das NF- $\kappa$ B System. Der Rezeptor TLR4 beispielsweise erkennt bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Ligand des TLR2 ist Peptidoglykan (PGN). Auch das CARD15-Protein fungiert in der Erkennung bakterieller Produkte und aktiviert das NF- $\kappa$ B-System, ist jedoch zytosolisch lokalisiert und dient dort als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile (30). Das spezifische Erkennungsantigen ist das bakterielle Muramyldipeptid (MDP). Den Mechanismus der Aktivierung erklärt man sich folgendermaßen: Eine leucinreiche Region (LRR) soll für die Erkennung verantwortlich sein (43). Daraufhin kommt es durch Interaktionen zwischen den N-terminalen CARDS und der Serin-Threonin-Kinase *regulatory protein kinase* (RICK) unter zusätzlich nötigem Vorhandensein von I $\kappa$ B-Kinasen (IKK) zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. Letztgenannte induzieren daraufhin die

Expression von Zielgenen, die zur Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität beitragen. Dazu gehören zum Beispiel Oberflächenrezeptoren des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) und inflammatorische Zytokine wie der Tumornekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (42, 63).

### 1.3.3 Bakterielle Bestandteile und ihre Rezeptoren

Bei der spezifischen Erkennung von PAMPs wird das angeborene Immunsystem als erste Stufe in der Verteidigung gegen Pathogene aktiviert. Diese Erkennung geschieht über spezifische PRRs, wie z.B. die TLRs oder das CARD15-Protein (30).

**LPS**, auch Exotoxine genannt, sind die bekanntesten PAMPs und die wichtigsten Bestandteile der Membran gramnegativer Bakterien. Sie wirken alleine oder adjuvant und lösen im menschlichen Organismus immunstimulatorische Effekte wie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, toxische und bei höherer Konzentration sogar lebensbedrohliche Prozesse aus (6). Erkannt werden sie über verschiedene PRRs. Es gibt Hinweise, dass dabei TLRs und das CARD15-Protein eine Rolle spielen (43).

**PGN** ist ein Bestandteil der Zellmembran gramnegativer und grampositiver Bakterien, findet sich bei letzteren jedoch höher konzentriert (98). Der CARD15-Rezeptor ist ein Sensor für gramnegatives und grampositives PGN (29) und führt bei Erkennung dieser zur Aktivierung proinflammatorischer Prozesse.

**MDP** ist der kleinste pathogene Bestandteil von PGN. Es konnte nachgewiesen werden, dass MDP die Struktur darstellt, die vom CARD15-Rezeptor erkannt wird, nicht jedoch von den membranständigen TLRs. MDP stellt somit ein spezifisches Erkennungsmolekül für das CARD15-Protein dar. Es hat sowohl einen eigenständigen, als auch zusammen mit LPS bzw. PGN einen synergistischen Effekt und löst eine Aktivierung des Nf- $\kappa$ B-Systems aus (29, 98).

Effekte auf alle genannten Antigene bleiben jeweils bei Vorhandensein von CARD15-Mutationen aus (29, 44, 62).

### 1.3.4 Crohn-assoziierte Mutationen im CARD15-Gen

Mit Morbus Crohn wurden bislang mehrere Mutationen im CARD15-Gen in Zusammenhang gebracht. Bei solchen Mutationen steigt das Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken um das 20-40fache an, wenn beide Allele betroffen sind, und um das 2-4fache, wenn nur ein Allel betroffen ist (7). Die drei häufigsten bislang bekannten Mutationen, die alle in der leucinreichen Erkennungsregion für bakterielle Bestandteile liegen, sind 3020insC, R702W und G908R (40) (Abbildung 1.2). Diese machen 82 % der bekannten mit Morbus Crohn assoziierten Mutationen aus, während in 18 % der Fälle eine der selteneren 27 Mutationen vorkommt (49). Bei den drei häufigsten Mutationen handelt es sich um *single nucleotide* Polymorphismen im CARD15-Gen.

**3020insC:** Die häufigste Genvariante ist die *frameshift* Mutation 3020insC in Exon 11, die durch Cytosin-Insertion zu einem Einbau eines Stoppcodons mit resultierend verkürztem CARD15-Protein führt. Funktionell äußert sich dieser Protein-Defekt in einer verminderten Aktivierung von NF-κB bei Stimulation mit bakteriellem LPS. Dies konnte *in vitro* an mit CARD15 transfizierten embryonalen Nierenzellen nachgewiesen werden (8, 62). Eine Aktivierung des NF-κB-Systems geschieht LPS-induziert jedoch auch über die TLRs. Erst mit der Entdeckung des CARD15-spezifischen Erkennungsmoleküls Muramyldipeptid (MDP) gelang die spezifischere Analyse der Bedeutung dieser Mutation (Kapitel 1.3.4.). Der Aktivierungseffekt bei Mutation bleibt bei Stimulation mit MDP im Gegensatz zu Zellen mit CARD15-Wildtyp aus (29).

**R702W und G908R:** Bei diesen beiden Mutationen handelt es sich um einen Aminosäure-Austausch in Exon 4 (R702W) beziehungsweise in Exon 8 (G908R). Strukturell wird das Protein nicht verkürzt, funktionell konnte auch bei diesen Mutationen durch *in vitro* Studien eine im Gegensatz zu Wildtyp-Kontrollen verminderte Aktivität von NF-κB nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen nachgewiesen werden (8, 40, 49).

Alle Mutationen scheinen also zu einer verminderten Erkennung bakterieller Bestandteile wie LPS, PGN und im speziellen des spezifischen Moleküls MDP zu führen. CARD15 scheint deshalb eine Rolle in der angeborenen Immunität zu spielen.

Die durch diese CARD15-Genmutationen verursachte herabgesetzte Aktivierbarkeit des NF $\kappa$ -B-Systems bei Vorhandensein stimulierender bakterieller Bestandteile *in vitro* (8, 62) steht im Gegensatz zur *in vivo* Situation von Morbus Crohn, die durch eine Überaktivierung des NF- $\kappa$ B-Systems charakterisiert ist (72).

### **1.3.5 CARD15-Genotyp und Morbus Crohn Phänotyp**

Aus der Tatsache, dass einige Patienten mit Morbus Crohn Träger einer Mutation in CARD15 sind und andere nicht, ergeben sich genotypisch zwei Patientengruppen. Diese Patienten unterscheiden sich auch im Phänotyp.

Über die Beziehung von CARD15-Mutationen und klinischer Präsentation des Morbus Crohn wurden zahlreiche Studien veröffentlicht. Das einzig konsistente Ergebnis betrifft die Lokalisation: Träger von CARD15-Mutationen zeigen überzufällig häufig eine Lokalisation im Ileum (3) mit häufigerer Durchführung einer Ileozökalresektion (3, 14, 34, 49). Das Kolon ist seltener beteiligt (49). Einige Arbeitsgruppen berichteten über einen Zusammenhang zwischen Mutation und fibrostenotischem Phänotyp (1, 3, 34, 49, 72), der Anwesenheit von Fisteln (1, 34, 72) oder der Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention (72), während andere Studien dies nicht bestätigten (2). Über ein jüngeres Alter zu Erkrankungsbeginn wurde außerdem bei Patienten mit zwei mutierten Allelen berichtet. Die Erkrankung beginnt bei diesen Patienten im Vergleich zu allen Patienten mit Morbus Crohn etwa zwei Jahre früher (3, 49).

### **1.3.6 Rolle von TNF- $\alpha$ und IL-10**

Die Produktion verschiedener, vor allem proinflammatorischer Zytokine, ist bei Patienten mit Morbus Crohn erhöht. Durch Versuche an *knockout*-Mäusen konnte die Bedeu-

gebung spezifischer Zytokine, wie die von TNF- $\alpha$  und Interleukin 10 (IL-10) nachgewiesen werden (20, 76).

**TNF- $\alpha$**  ist ein Zytokin, das Signale zwischen Immunzellen und anderen Zellen vermittelt. Es wird von verschiedenen immunkompetenten Zellen wie den Monozyten gebildet und spielt eine zentrale Rolle als proinflammatorischer Mediator. Daneben ist es in verschiedene zelluläre Prozesse wie Apoptose, Thrombose, Fibrinolyse und in den Metabolismus involviert (94). Die Produktion von TNF- $\alpha$  wird auf allen Ebenen der Transkription, Translation und Post-Translation streng reguliert, was für die Notwendigkeit eines Schutzes gegen unregulierte TNF- $\alpha$ -Sekretion spricht. Die mRNA von TNF- $\alpha$  hat durch seine UAUUAU-reichen Regionen eine kurze Halbwertszeit (91). In einer neueren Studie konnte gezeigt werden, dass MDP einen Einfluss auf die Produktion von TNF- $\alpha$  mRNA, nicht jedoch auf die Sekretion von TNF- $\alpha$  Proteinen hat (98). Die Transkription in Monozyten wird durch Corticosteroide *down*-reguliert (91). In der entzündeten Darmschleimhaut und in immunkompetenten Zellen von Patienten mit Morbus Crohn ist TNF- $\alpha$  deutlich erhöht und führt zu inflammatorischen Prozessen (38). Die pathogenetische Funktion von TNF- $\alpha$  wird therapeutisch durch den Einsatz von TNF- $\alpha$ -Antikörpern bei Corticosteroid-resistentem Morbus Crohn genutzt. Deren Einsatz ist jedoch durch unerwünschte Wirkungen bei wiederholter Gabe limitiert (71).

**IL-10** ist ein Zytokin mit antiinflammatorischer Wirkung. Die Produktion von IL-10 in verschiedenen immunkompetenten Zellen wird durch die Anwesenheit von TNF- $\alpha$  stimuliert (11). IL-10 wiederum hemmt die Synthese verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 in Monozyten, außerdem induziert es die Proliferation von B-Zellen und die Proliferation zytotoxischer T-Zellen (81). *In vitro*-Studien zeigten bei Anwesenheit von MDP in Vollblut eine erhöhte Produktion von TNF- $\alpha$ , nicht jedoch von IL-10 (95).



## **1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit**

Der Morbus Crohn stellt eine Erkrankung dar, die jüngere Patientinnen und Patienten betrifft und oft mit großen Einschränkungen der Lebensqualität einhergeht. Die Ätiologie ist weitgehend ungeklärt, weshalb eine kausale Therapie bislang fehlt. Die aktuelle Theorie der multifaktoriellen Krankheitsätiologie ist komplex: zwischen Umweltfaktoren (z.B. bakterielle Bestandteile), genetischer Disposition (z.B. CARD15-Mutationen) und Effekt (z.B. Entzündung) steht eine Reihe hoch regulierter Schritte. Zentrales Ziel der Morbus Crohn-Forschung ist es, durch ein verbessertes Verständnis der Immunpathogenese Implikationen für eine kausale Crohn-Therapie herzustellen. Seit Entdeckung der Prädisposition von Morbus Crohn bei CARD15-Mutationen (40, 62) rückte die Beurteilung der krankheitsspezifischen Auswirkungen dieser Mutationen in den Vordergrund.

Durch die Entdeckung der Assoziation von Mutationen im CARD15 Gen und Morbus Crohn (40, 62) haben sowohl genetische Faktoren als auch bakterielle Bestandteile an Bedeutung in der Ätiologie zugenommen. Bislang ist jedoch unklar, inwiefern CARD15-Mutationen funktionell die Entstehung eines Morbus Crohn bedingen. Erst durch die aus jüngsten Studien hervorgegangene Entdeckung des CARD15-spezifischen bakteriellen Bestandteils MDP (29, 44) wurden genauere Funktionsanalysen zur Klärung der Bedeutung der CARD15-Mutation möglich.

Studien, die auf eine Klärung des Einflusses von CARD15 Mutationen auf die Pathogenese des Morbus Crohn abzielten, konnten bereits *in vitro* eine im Gegensatz zum Wildtyp erniedrigte Nf-κB-Expression bei mutiertem CARD15-Gen feststellen (8, 40, 49). Eine ausreichende Prüfung *ex vivo* sowie der Auswirkung auf den *downstream*, also die Umsetzung in Zytokine, fehlte bislang. Dies ist von essentieller Bedeutung, da die Zytokine in ihrer Auswirkung dem Krankheitsprozess näher stehen als die NF-κB-Ebene und bis zu ihrer Umsetzung eine Regulation durch zahlreiche Zwischenschritte

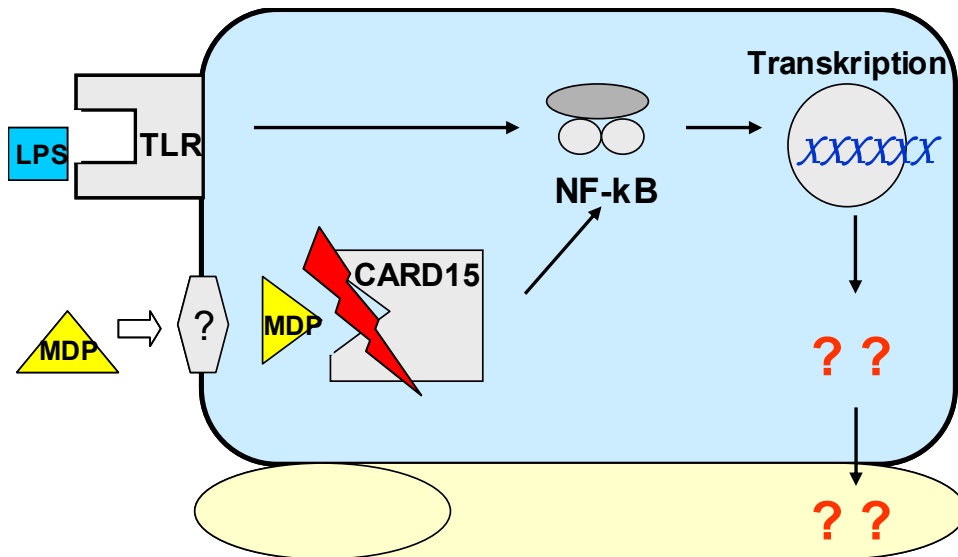
steht (91). Hierfür eignet sich die Prüfung der sensitiven mRNA-Ebene von für Morbus Crohn relevanten Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-10. Die Bedeutung der MDP Signalisierung wurde bereits an Studien mit *CARD15-knockout* Mäusen bestätigt (67), jedoch rücken aufgrund der Unterschiede zwischen angeborenem Immunsystem von Maus und Mensch (73) Studien mit humanen Zellen in den Vordergrund.

Ziel dieser Arbeit war es daher, bisherige Erkenntnisse der über bakterielle Bestandteile vermittelten Immunpathogenese des *CARD15*-assoziierten Morbus Crohn zu erweitern.

Endziel der vorliegenden Arbeit war:

1. die Beurteilung der *ex vivo* mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  (proinflammatorisch) und IL-10 (antiinflammatorisch) in Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn und Gesunden nach spezifischer Stimulation mit dem bakteriellen *CARD15*-Erkennungsmolekül MDP (Abbildung 1.3).
2. die Überprüfung auf ein je nach *CARD15*-Genotyp unterschiedliches MDP-induziertes Expressionsmuster der Patienten mit Morbus Crohn (homozygote 3020insC Mutation versus Wildtyp) im Vergleich zu Gesunden (Wildtyp).

Die Klärung des Einflusses der Mutation auf die TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expression könnte zur Erkenntnis einer weiteren Stufe in der Pathogenese des durch *CARD15*-Mutation bedingten Morbus Crohn führen und damit eine Grundlage für Möglichkeiten einer kausalen Therapie bieten.



**Abbildung 1.3:**

Schematische Darstellung extrazellulärer und intrazellulärer Aktivierung und Fragestellung dieser Arbeit. Dargestellt sind die oberflächlichen Toll-like-Rezeptoren (TLR), die über LPS-Stimulation zu einer Aktivierung des NF-κB Systems führen, und der intrazelluläre CARD15-Rezeptor, der spezifisch über MDP zu einer solchen Aktivierung führt. Geklärt werden soll der Einfluss des CARD15-Gens in der MDP-vermittelten Signalisierung auf den posttranskriptionellen *downstream* bei Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn mit und ohne Mutation in CARD15 und bei Gesunden.

## 2 Patienten und Material

### 2.1 Studienpopulation

Alle untersuchten Patienten und Probanden der Studienpopulation (n = 13) nahmen freiwillig an der Studie teil, wurden vollständig über Inhalt und Ziele der Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihre mündliche oder schriftliche Einwilligung zur Aufnahme in die Studie. Die Patienten mit Morbus Crohn wurden aus einer Studienpopulation ausgewählt, die in einer Vorarbeit bezüglich der 3020insC-Mutation in CARD15 typisiert worden war (72). Die beiden anderen mit Crohn assoziierten Mutationen (R702W und G908R) wurden bei diesen Patienten ausgeschlossen. Bei den Patienten mit Wildtyp sowie bei den gesunden Probanden wurde keine der drei Crohn-assoziierten Mutationen nachgewiesen.

Die Patienten befanden sich in ambulanter oder stationärer Betreuung in der Medizinischen Klinik bzw. Medizinischen Poliklinik Innenstadt oder Großhadern der LMU München. Alle Studienpatienten waren kaukasischer Herkunft. Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose eines Morbus Crohn. Es wurden nur Patienten aufgenommen, die in den vorausgegangenen 6 Monaten nicht mit TNF- $\alpha$  Antikörpern oder hochdosierter Steroidtherapie behandelt worden waren. Als Material diente venös entnommenes Vollblut. Die Basisdaten der drei Studienpopulationen sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

**Tabelle 2.1:**

Basisdaten des Studienkollektivs

	<b>Kontrollkollektiv</b>	<b>Patienten mit Morbus Crohn</b>	
Mutation in CARD15/NOD2 (C2104T, G2722C, 3020insC)	keine	Keine	homozygot für 3020insC
Probanden / Patienten (Anzahl)	3	5	5
Altersdurchschnitt (Jahre)	36,3	46,0	51,0
Altersverteilung (Jahre)	25-54	22-70	25-76
Geschlechterverhältnis (weiblich / männlich)	3 / 0	3 / 2	2 / 3

## 2.2 Kits und Chemikalien

Zur Durchführung der Versuche wurden kommerzielle Komplettsysteme (Tabellen 2.3, 2.5, 2.6, 2.7) und zusätzliche Chemikalien und Materialien verwendet (Tabellen 2.2, 2.4, 2.8, 2.9).

**Tabelle 2.2:**

Chemikalien und Lösungsmittel zur Zellisolation

Bezeichnung	Quelle
Autologes humanes AB Serum, 10 %	SIGMA, Steinheim, Deutschland
Albumin Bovine Fraction V Solution, 30 % (BSA)	SIGMA, Steinheim, Deutschland
EDTA : Titriplex III <sup>®</sup>	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Erythrozyten-Lyse-Puffer :	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
- 155 mM NH <sub>4</sub> Cl	
- 1 mM EDTA	
- 10 mM KHCO <sub>3</sub>	
Fetal Bovine Serum (FBS)	ATTC, Manassas, USA
Ficoll-Paque Plus <sup>®</sup>	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Percoll <sup>™</sup> (density 1,130 g/ml)	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Phosphate Buffered Saline (PBS)- Puffer	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU

**Tabelle 2.3:**

Komplettsystem zur Monozytenisolation

System	Inhalt	Firma
<b>MACS Monocyte Isolation Kit</b>	humanes Immunglobulin CD3 (mouse IgG2a) CD7 (mouse IgG2a) CD45RA (mouse IgG1) anti-IgE (mouse IgG2a) Anti-Hapten Microbeads	Milteny Biotec, Auburn, California

**Tabelle 2.4:**

Medien und Medienzusätze zur Kultivierung und Stimulation

<b>Inhalt</b>	<b>Firma</b>
HEPES Puffer	ATTC, Manassas, USA
L-Glutamin	ATTC, Manassas, USA
Muramyl Dipeptid (MDP, Ac-muramyl-Ala-D-Glu-NH <sub>2</sub> )	Bachem, Bubendorf, Schweden
Paraformaldehyd	MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland
Penicillin 1000 U/ml	Bio Whittaker EuropeVerviers, Belgien
RMPI-1640Medium Vitacell	ATTC, Manassas, USA
Streptomycin 1000 µg/ml	Bio Whittaker EuropeVerviers, Belgien

**Tabelle 2.5:**

Komplettsystem zur RNA-Isolation

<b>System</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Firma</b>
<b>RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit</b>	QIAshredder spin column Rneasy mini spin column RLT Puffer RW1 Puffer RPE Puffer RNase-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Germany

**Tabelle 2.6:**

Komplettsystem zur cDNA-Synthese

<b>System</b>	<b>Primer für LightCycler</b>	<b>Firma</b>
<b>1st Strand cDNA Sythesis Kit for RT-PCR (AMV)</b>	- HPRT - GAPDH - β-Aktin - IL-10 - TNF-α	LC-Search, Gießen, Deutschland

**Tabelle 2.7:**

Komplettsystem zur PCR-Vorbereitung

<b>System</b>	<b>Inhalt</b>	<b>Firma</b>
<b>LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I</b>	FastStart Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim, Deutschland

**Tabelle 2.8:**

sonstige Chemikalien

<b>Material</b>	<b>Quelle</b>
70 % Ethanol	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU
100 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA
250 bp DNA Ladder	Invitrogen, USA

**Tabelle 2.9:**

Materialien

<b>Material</b>	<b>Quelle</b>
Eppendorf UVette <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
LC Centrifuge Adapters	Roche, Mannheim, Deutschland
Leucosep tubes <sup>®</sup>	MERCK, Darmstadt, Deutschland
LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler Sample Carousel	Roche, Mannheim, Deutschland



## 2.3 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Abzug	Köttermann
BioPhotometer	Eppendorf
Kühlschrank 4° C, -20° C, -80° C	Liebherr
LightCycler Instrument	Roche
MiniMACS Magnet	Milteny Biotech
MiniMACS Seperator	Milteny Biotech
Peltier Thermal Cycler PTC -200	Biozyme
Pipetten (10, 60, 200, 1000 µl)	Gilson
Tischzentrifuge	Axon
Vortex-Schüttler	CAT
Zentrifuge mit Kühlung	Jouan
Zentrifuge und Eindampfer	Jouan

## 3 Methoden

### 3.1 Vorversuche

#### 3.1.1 Methodenauswahl zur Monozytenisolation

Die Durchführung von Isolation und Stimulation der Monozyten fand in Kooperation mit dem Gastroenterologischen Labor der Medizinischen Klinik und Poliklinik der LMU München statt. Um während der Isolation der Monozyten eine gute Reinheit zu erreichen, die Monozyten nicht während der Isolation zu stimulieren und möglichst keine Apoptose herbeizuführen, war die Auswahl einer geeigneten Methode zur Monozytenisolation von entscheidender Bedeutung. Zu diesem Zweck wurden vor Beginn der Studie folgende Verfahren getestet: Adhärenzmethode, Percoll-Dichtezentrifugation und Zellisolation mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS). Die Reinheit der Monozyten wurde nach der jeweiligen Isolation mittels *fluoreszenz-activated cell sorting* (FACS)-Analyse festgestellt. Die Apoptoserate konnte mittels Anfärbung mit Trypanblau und Auszählung im Lichtmikroskop abgeschätzt werden.

#### *Adhärenzmethode:*

Nach einer Dichtezentrifugation mit Ficoll wurden die peripheren mononuklearen Zellen (PBMC) isoliert, in PBS-Puffer resuspendiert und verschieden oft gewaschen (genaue Beschreibung siehe Kapitel 3.3.1). Die Zellen wurden gezählt und mit Nährmedium auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml der Suspension wurde in Petrischalen pipettiert. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank (37° C, 5 %ige CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) adhärten die Monozyten an der Oberfläche der Platten. Anschließend konnten die übrigen Zellen im Überstand des Mediums durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Die adhärierenden Zellen wurden von der Plattenoberfläche abgeschabt, gezählt und für die FACS-Analyse gefärbt und fixiert.

#### *Percoll-Dichtezentrifugation:*

Die Separation der PBMCs erfolgte wiederum mittels Ficoll-Zentrifugation (siehe Kapitel 3.3.1). Die isolierten Zellen wurden in 4 ml 60 %igem isoosmotischem Percoll (Percoll:NaCl = 9:1) gelöst und zuerst mit 47,5 %igem, dann mit 37 %igem Percoll überschichtet. Nach einer 40minütigen Zentrifugation (1700 g) konnten zwei Pellets abgenommen werden, wobei sich in dem oberen Ring größtenteils Monozyten, im unteren Ring vor allem Lymphozyten befanden. Nach Waschschritten konnten die Zellen wiederum zur FACS-Analyse gefärbt und fixiert werden.

#### *MACS:*

Die negative Aufreinigung der Monozyten mit *magnetic beads* wird in Kapitel 3.3.2 ausführlich beschrieben.

#### *FACS-Analyse:*

Mit der Methode der Durchflusszytometrie wurden die Zellen in einem FACS-Gerät mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen spezielle Oberflächenantigene aufgetrennt. Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenantigene der verschiedenen Zelltypen konnte die Reinheit der isolierten Monozyten bestimmt werden.

### **3.1.2 Erstellen einer Zeitkurve**

Zur Ermittlung des Zeitpunktes der höchsten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-10 wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Dabei wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit MDP die Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-10 mittels *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) bestimmt. Der Zeitpunkt mit der höchsten TNF- $\alpha$  und IL-10 Freisetzung wurde für alle weiteren Versuche verwendet.

### 3.1.3 Validierung der total RNA-Menge

Jede Stimulation wurde zu jedem Zeitpunkt an drei gleichen Proben durchgeführt. Aufgrund der Dreifachbestimmung der Proben war die Menge jeder einzelnen Probe gering. Deshalb war eine Validierung der geeigneten mRNA-Menge nötig.

Um festzustellen, ob eine Menge von 100 ng total RNA zur Durchführung der cDNA-Synthese ausreicht, um valide Ergebnisse zu erreichen, wurden folgende Vorversuche durchgeführt: cDNA wurde drei Mal unter Einsatz von 100 und drei Mal mit 1000 ng total RNA von unstimulierten Monozyten eines gesunden Probanden synthetisiert. Die mRNA-Kopienzahl von GAPDH, TNF- $\alpha$  und IL-10 der verschiedenen Proben konnte nun mittels PCR ermittelt und miteinander verglichen werden.

### 3.1.4 Auswahl des *house-keeping-gene*

Zur Normierung der mRNA-Expression der beiden ermittelten Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-10 war ein geeignetes *house-keeping-gene* nötig. Voraussetzung für die Auswahl eines solchen Gens ist die von äußeren Einflüssen weitgehend unbeeinflusste Expression. So kann es für die Normierung der cDNA Synthese des *genes of interest* dienen. Aufgrund ihrer weitgehend gleich bleibenden Expression eignen sich hierzu insbesondere Gene des Stoffwechsels und des Zytoskeletts (25, 31). Auswahlkriterium für ein geeignetes *house-keeping-gene* für die vorliegende Studie war eine weitgehend unbeeinflusste Expression durch die MDP Stimulation. Hierzu wurden die Expressionsmuster der *house-keeping-genes* HPRT,  $\beta$ -Aktin und GAPDH bei stimulierten und unstimulierten Monozyten bestimmt und miteinander verglichen.

## 3.2 **Hauptversuche**

### 3.2.1 **Isolierung von Monozyten mittels MACS**

Zur Vorbereitung für die Monozytenseparation erfolgte zunächst die Separation mononuklearer Zellen aus heparinisiertem Blut mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation. Die Blutproben wurden in 9 ml EDTA-Röhrchen abgenommen. Am selben Tag wurden jeweils 15-30 ml des frisch entnommenen heparinisierten Bluts im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und mit 20 ml Ficoll-Paque Plus in Leucosep Röhrchen zentrifugiert (35 min, 400 g, 4° C). Die mononuklearen Zellen (PBMC) wurden aus der Plasma-Ficoll-Interphase entfernt, jeweils zweimal mit PBS und danach einmal mit PBS, BSA und 2 mM EDTA gewaschen (300 g, 10 min) bevor der Überstand abpipettiert werden konnte. Pro  $10^7$  Zellen wurden folgende Reagenzien zugegeben:

- 60 µl Puffer-Serum-Mixes (PBS, 0,5 % BSA, 2mM EDTA, 10 % humanes Serum)
- 20 µl *FCR Blocking Reagent*
- 20 µl *Hapten-Antibody Cocktail* (monoklonale, an Haptene gebundene magnetische Antikörper gegen CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 und IgE) (Tabelle 2.3).

Der Reaktionsmix wurde 5 min bei 4° C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit der 20fachen Menge des Puffer-Serum-Mixes wurden nochmals die oben genannten Mengen an Puffer-Serum-Mix, *FCR Blocking Reagent* und *Hapten-Antibody Cocktail* pro  $10^7$  Zellen zugegeben und diesmal 15 min bei 4° C inkubiert. Die Zellen wurden noch einmal mit dem Puffer-Serum-Mix gewaschen und danach in 500 µl Puffer-Serum-Mix resuspendiert.

Bei der immunomagnetischen Zellsortierung mittels MACS-Technik werden bestimmte Zellen aus heterogenen Zellgemischen mit Hilfe von Magnetpartikeln, die mit spezifischen Antikörpern behaftet sind, separiert (23). Hierbei gibt es die Möglichkeit der

Positivseparation, bei der Antikörper gegen die zu isolierende Zellart gerichtet sind, und die der Negativseparation. Bei der hier verwendeten Negativseparation binden die Antikörper an alle Zellen außer an den zu isolierenden Monozyten, um dann von der zu isolierenden Zellart magnetisch abgetrennt zu werden (55).

Nach Vorfiltration in *Preseparation Filters* im *MiniMACS Separator* wurde die Zellsuspension durch die in einem MiniMACS Magneten fixierten *LS Separation Column* (Miltenyi Biotec) laufen gelassen, und mit 12 ml des Puffer-Serum-Mixes nachgespült. Bei Passage der Säule fixierten alle durch die Antikörper magnetisierten mononuklearen Zellen, also alle mononuklearen Zellen außer den Monozyten magnetisch an der Säule, die Monozyten wurden im Durchlauf aufgefangen. Durch die magnetische Abtrennung aller anderen Zellen wurden die Monozyten somit isoliert. Die Monozyten wurden in der Zählkammer gezählt. Die Reinheit der Monozyten wurde durch FACS-Analyse unter Verwendung eines anti-CD14-Antikörpers überprüft.

### **3.2.2 Zellkultur und Stimulationsprotokoll**

Die Monozyten wurden zu einer Endkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI 1640 Medium suspendiert, das mit 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES (ATTC) 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Bio Whittaker Europe) und 1 % steriles, durch Hitze inaktiviertes menschliches AB-Serum (Sigma) ergänzt wurde.

200 µl der Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen) wurden in die Löcher einer Kulturplatte gegeben und über Nacht bei 37° C in einer feuchten 5 %igen CO<sub>2</sub> Atmosphäre belassen. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium ausgetauscht und durch frisches Medium ersetzt, das entweder 100 ng/ml Muramyldipeptid oder keine Stimulanz enthielt. 1,5 und 6 Stunden später wurden die Zellen mit 350 µl 1 % β-Mercaptoethanol-haltigem RLT Puffer (Qiagen) lysiert und bis zur RNA-Isolierung bei -80° C gelagert (Tabelle 2.7). Alle Experimente wurden je Probe in 2- oder 3facher Form ausgeführt.

### 3.2.3 Isolierung von total RNA aus Monozyten

Die Isolierung der total RNA erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen). Die lysierten Monozyten wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die gesamte Suspension wurde mit Hilfe einer Shreddersäule homogenisiert und vorfiltriert. Durch die Zugabe von 350 µl 70 %igem Ethanol verdünnt mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat-Wasser wurde die positiv geladene RNA vorbereitet, um an die negativ geladene Silica-Gel-Matrix der RNA-Isolierungssäule zu binden. Nach Beladung der Säule mit 700 µl des Homogenats und Zentrifugation (15 s, 8000 g, 20° C) wurde der Durchlauf verworfen, die Säule mit 700 µl RW 1 Waschpuffer beladen und erneut zentrifugiert (15 sec, 8000 g, 20° C). Nach zweimaligem Waschen mit je 500 µl RPE-Puffer und Trockenzentrifugation wurde die total RNA mit 60 µl RNase freiem Wasser eluiert (Tabelle 2.4). Nach Bestimmung des Eluatvolumens wurde die total RNA Konzentration photometrisch bei  $\lambda=260$  nm bestimmt sowie die Reinheit der RNA (260/280 nm) geprüft.

### 3.2.4 cDNA Synthese/reverse Transkription

Das Suspensionsvolumen, in dem 100 ng total RNA gelöst waren, wurde rechnerisch mit Hilfe der Photometerdaten ermittelt und einheitlich auf 8,2 µl in einer Zentrifuge mit Vakuumpumpe bei 46° C eingedampft. Die darauf folgende 15 minütige Denaturierung bei 65° C diente dazu, die intramolekularen RNA-Strukturen (*stem-loops*) durch die irreversible Denaturierung der RNA-stabilisierenden Proteine, RNasen und anderer Störfaktoren für die reverse Transkription vorzubereiten. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Kits (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) Roche, Tabelle 2.5). Um den Einzelstrangcharakter der RNA zu sichern, wurde die Suspension unmittelbar nach der Denaturierung für zirka 5 Minuten auf Eis gekühlt.

Danach wurde zu der auf 8,2 µl eingedampften total RNA-Suspension folgender Reaktions-Mix zugegeben:

- 2 µl 10x Reaction Buffer
- 4 µl 25 mM Magnesiumchlorid
- 2 µl 10 mM Deoxynucleotid Mix
- 2 µl Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer (0,82 µg/µl)
- 1 µl RNase Inhibitor
- 0,8 µl reverse Transkriptase

Die reverse Transkription erfolgte im Peltier Thermal Cyclers (Biozyme) nach folgendem Protokoll: Die 10 minütige *Annealing*-Phase (25° C) diente dazu, den Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer spezifisch an den *poly-A-tail* der humanen mRNA binden lassen zu können. Die Transkription erfolgte 60 min lang bei 42° C durch die AMV reverse Transkriptase. Um Artefakte bei folgenden Schritten zu vermeiden, wurde die AMV reverse Transkriptase 5 min bei 99° C denaturiert. Nach einer Abkühlung auf 4° C konnten die Proben bei -20° C gelagert werden.

### 3.2.5 RT-PCR/Light Cyclers

Folgende Gene der aus humaner mRNA synthetisierten cDNA wurden mittels *Polymerase chain reaction* (PCR) quantifiziert:

*genes of interest*: IL-10, TNF- $\alpha$

*house-keeping-genes*: HPRT,  $\beta$ -Aktin, GAPDH

Die Primer-Sequenzen für die zu untersuchenden Gene liegen dem Hersteller vor (Search LC GmbH, Heidelberg).

Die mRNA Quantifizierung eines Gens mittels RT-PCR erfolgte jeweils für maximal 25 Proben, 5 Standardproben, eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle in einem mit 32 Positionen besetzten *LightCycler (LC) Sample Carousel*. Die verschiedenen Ansätze



wurden in *LC Capillaries* pipettiert, die in *LC Centrifuge Adapters* auf 4° C gekühlt wurden. Nach Zentrifugation (4 min, 400 g, 4° C) wurden die Kapillaren in einem *LC Sample Carousel* im *LightCycler Instrument* (Roche, Mannheim, Deutschland, Abbildung 3.1) platziert.



**Abbildung 3.1:**  
LightCycler Instrument (Bild aus [www.roche.de](http://www.roche.de))

### Standardkurve

Anhand einer Standardkurve (Abbildung 4.4), die mit Hilfe einer Verdünnungsreihe aus fünf bekannten mRNA-Standardkonzentrationen (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000) des jeweiligen Gens erstellt wurde, konnte die exakte Menge des mRNA Äquivalents bestimmt und in Kopien angegeben werden. Die spezifische Bindung von *SYBR Green I* an Doppelstrang-DNA bewirkte eine starke Fluoreszenzerhöhung, so dass die Menge der PCR-Produkte über die Fluoreszenz messbar war. Die Reaktionen für die fünf genannten Standardkonzentrationen wurden jeweils wie folgt angesetzt:

- 10 µl Standardvolumen
- 2 µl genspezifischen Primer (LC-Search)
- 2 µl SYBR Green I Mix (Roche)
- 6 µl Wasser

### **Positivkontrolle**

Die Positivkontrolle diente dazu, die Qualität der Durchführung der Reaktionsansätze sowie die der Durchführung der PCR selber zu überprüfen. Reaktionsansatz:

10 µl bekannte cDNA Kopienzahl des untersuchten Gens

2 µl genspezifischen Primer (LC-Search)

2 µl SYBR Green I Mix (Roche)

6 µl Wasser

### **Negativkontrolle**

Zur Überprüfung einer eventuellen Kontamination der Reaktionsansätze mit einem unerwünschten Gen wurde eine Negativkontrolle mit sterilem Wasser durchgeführt:

10 µl Wasser

2 µl genspezifischen Primer (LC-Search)

2 µl SYBR Green I Mix (Roche)

6 µl Wasser

### **Proben**

1 µl cDNA

2 µl genspezifischen Primer (LC-Search)

2 µl SYBR Green I Mix (Roche)

15 µl steriles Wasser

Die *“Hot Start” Realtime Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)* wurde im *LightCycler Instrument* (Abbildung 3.1) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- **Denaturierung** (95° C, 10 min): Aktivierung der FastStart Taq DNA Polymerase (Roche), die eine modifizierte Form der thermostabilen rekombinanten Taq DNA Polymerase darstellt (*hot start*).
- 45 Zyklen **Amplifikation**: je 10 sec bei 95° C, 10 sec bei 68° C und 16 sec bei 72° C.

- **Schmelzkurvenanalyse** zur Überprüfung der Spezifität: Erhitzung auf 95° C, Abkühlung auf 58°C und schließlich langsame (0,1°C/min) Erhitzung auf 95° C (Abbildung 4.5).

### 3.2.6 Agarose Gelelektroforese

Zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse wurden die PCR-Produkte in einem 1,5 %igen Agarosegel mit 6 µl 1 % Ethidiumbromidlösung auf ihre Spezifität, das Vorhandensein von Primer-Dimeren sowie auf den Gehalt genomischer DNA überprüft. Zur Charakterisierung der PCR-Produkte wurden 100 und 250 bp DNA Ladder (Invitrogen) verwendet.

### 3.3 **Klinische Auswertung**

Zum Zeitpunkt der für die Studie erfolgten Blutentnahmen wurden bei beiden Patientenkollektiven mögliche Einflussfaktoren auf die mikrobiologischen Ergebnisse sowie das klinische Bild der Patienten erfasst. Die Aktivität des Morbus Crohn zu diesem Zeitpunkt wurde mit Hilfe des *Crohn`s Disease Activity Index* (CDAI) nach Best beurteilt (Anhang: Abbildung 8.1). Zusätzlich dienten Blutuntersuchungen (differenziertes Blutbild, CRP, Eisen, Ferritin) zur Einstufung der Crohn-Aktivität.

Zur Einschätzung des Krankheitsverlaufs wurden die Patientenakten auf die in Tabelle 3.1 aufgeführten Kriterien untersucht. Die aufgeführten Kriterien der Patientenkollektive mit und ohne Mutation wurden miteinander verglichen.

**Tabelle 3.1:**

Untersuchungen der Patientenpopulationen  
zum Krankheitsverlauf

<b>Alter bei Diagnose</b>
<b>Lokalisation des Morbus Crohn</b>
<b>Komplikationen</b> (Fisteln, Stenosen, Perforation, Abszess, Perforation)
<b>Chirurgische Interventionen</b>
<b>Extraintestinale Manifestation</b>
<b>Medikamentöse Therapie</b>

### **3.4 Statistische Auswertung**

Zur Datenerfassung diente das Programm EXCEL (Microsoft), zur statistischen Auswertung das Programm SigmaStat (SYSTAT) und zur graphischen Darstellung das Programm SigmaPlot (SYSTAT). Die Bestimmung des Signifikanzniveaus erfolgte bei den abhängigen Stichproben mittels Wilcoxon Test, bei den unabhängigen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Signifikanzgrenze wurde für  $p < 0,05$  % festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Studienpopulation – Klinik

Insgesamt wurden 10 Patienten und 3 gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen (Tabelle 3.1). Zum Zeitpunkt der Probenentnahme waren alle Patienten mit einem mittleren CDAI von 39 (20-123) klinisch in Remission. Weder Patienten noch Gesunde erhielten im Zeitraum der vorangegangenen 6 Monate eine Therapie mit Anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern oder hochdosierten systemischen Glukokortikoiden. Eine Auflistung von Therapie, Crohn-Aktivität und Blutwerten zum Zeitpunkt der für die Studie erfolgten Blutentnahme findet sich in nachfolgenden Tabellen. Hämoglobin und Hämatokrit waren zum Zeitpunkt der studienrelevanten Abnahme bei vier Patienten erniedrigt. Erhöht waren Leukozyten bei zwei, neutrophile Granulozyten bei drei und eosinophile Granulozyten bei einem der Patienten. Klinisch relevante Unterschiede zwischen den Gruppen fanden sich bezüglich Medikation und Blutwerten nicht (Tabellen 4.1a und 4.1b).

**Tabelle 4.1 (a)**

Klinische Einflussgrößen (Medikation, Aktivität des Crohn) zum Zeitpunkt der für die mikrobiologischen Untersuchungen der vorliegenden Studie erfolgten Blutentnahme.

	<b>Patienten mit Morbus Crohn</b>	
<b>Mutation in CARD15/NOD2</b>	<b>Wildtyp</b>	<b>3020insC homozygot</b>
Anzahl Patienten	n = 5	N = 5
<b>CDAI:</b>		
Mittelwert	35,2	42,8
Verteilung	20 – 53	42 – 123
<b>Medikation (Anteil an Patienten):</b>		
Orale Glukokortikoide	2/5	1/5
Azathioprin	1/5	1/5
5-ASA	3/5	2/5
Fe <sup>2+</sup>	1/5	1/5
Acetylsalicylsäure	0/5	1/5
Cholecalciferol	3/5	1/5
Calcium	2/5	1/5
Jod, Cholestyramin	0/5	1/5
Biphosphonat	1/5	1/5
Esidrix	0/5	1/5

**Tabelle 4.1 (b)**

Crohn-relevante Blutwerte zum Zeitpunkt der für die mikrobiologischen Untersuchungen der vorliegenden Studie erfolgten Blutentnahme.

	<b>Patienten mit Morbus Crohn</b>	
	<b>Wildtyp</b>	<b>3020insC homozygot</b>
<b>Mutation in CARD15/NOD2</b>		
Anzahl Patienten	n = 5	n = 5
<b>Blutuntersuchungen:</b>		
HB (14,0-17,5 g/dl)	13,1-14,9	10,8-12,2
HK (36,0-48 %)	38,6-41,3	31,8-38,6
Thrombozyten (150-350x10 <sup>3</sup> /μl)	151-257	213-354
Lymphozyten (25-40 %)	14,4-26,1	7,2-28,2
Leukozyten (4,0-11,3x10 <sup>3</sup> /μl)	3,5-11,1	3,3-9,8
Neutrophile (50-70 %)	61,4-79,8	60,8-86,8
Eosinophile (<4 %)	0,1-4,5	1-1,2
Basophile (<1 %)	0,3-0,7	0,2-0,3
Monozyten (<15 %)	4-8,3	4,9-9,4
CRP (< 0,5 mg/dl)	0,06-0,5	0,07-0,18
Fe <sup>2+</sup> (37,0 – 160,0 μg/dl)	63,6-88,6	39,6-65,8
Ferritin (30,0 – 300 μg/dl)	8-92	19,3-76
Albumin (3,8 – 5,1 g/dl)	3,9-4,8	4,3-4,9



## 4.2 Vorversuche

### 4.2.1 Etablierung der Stimulation

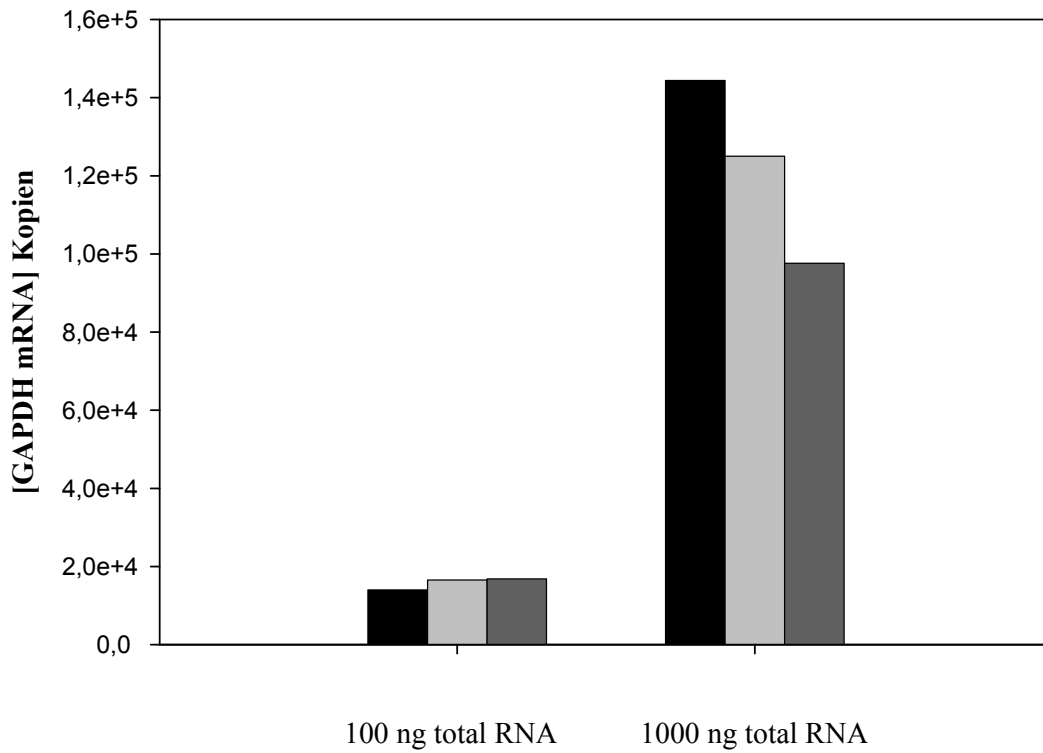
In der Methodenauswahl zur Monozytenisolation lag bei der Adhärenzmethode die Reinheit der Monozyten zwischen 28-58 %. Die besten Ergebnisse wurden hierbei durch häufiges Waschen erlangt. Auch bei der Percoll-Dichtezentrifugation lag die Reinheit der Monozyten bei nur 50-71 %, während die Isolierung mittels MACS eine Reinheit von 85-86 % ergab. Deshalb wurde für alle weiteren Untersuchungen die MACS Methode verwendet.

Als Zeitpunkt der höchsten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-10 nach Stimulation mit MDP stellte sich der Zeitpunkt 6 Stunden als am besten geeignet heraus. Dementsprechend wurde für die Bestimmungen der äquivalenten mRNA Edukte eine Stimulationsdauer von 1,5 Stunden festgelegt.

Bezüglich der Validierung der für die Versuche verwendeten mRNA Menge wurde bei einem Einsatz eines Zehntels von 1000 ng total RNA (100 ng) ein Zehntel der mRNA Expression dieser Proben erwartet. Entgegen dieser Annahme wurde mehr, nämlich jeweils etwa 1/6 der mRNA Menge, exprimiert. Die einzelnen drei Proben der Dreifachbestimmung wichen nicht stark voneinander ab (Abbildung 4.1). Da es sich um eine Studie handelt, in der verschiedene Gruppen miteinander verglichen wurden, waren nicht die absoluten Werte, sondern die Relationen der Ergebnisse zueinander relevant. Deshalb konnte für die cDNA-Synthese der vorliegenden Studie jeweils 100 ng total RNA eingesetzt werden.

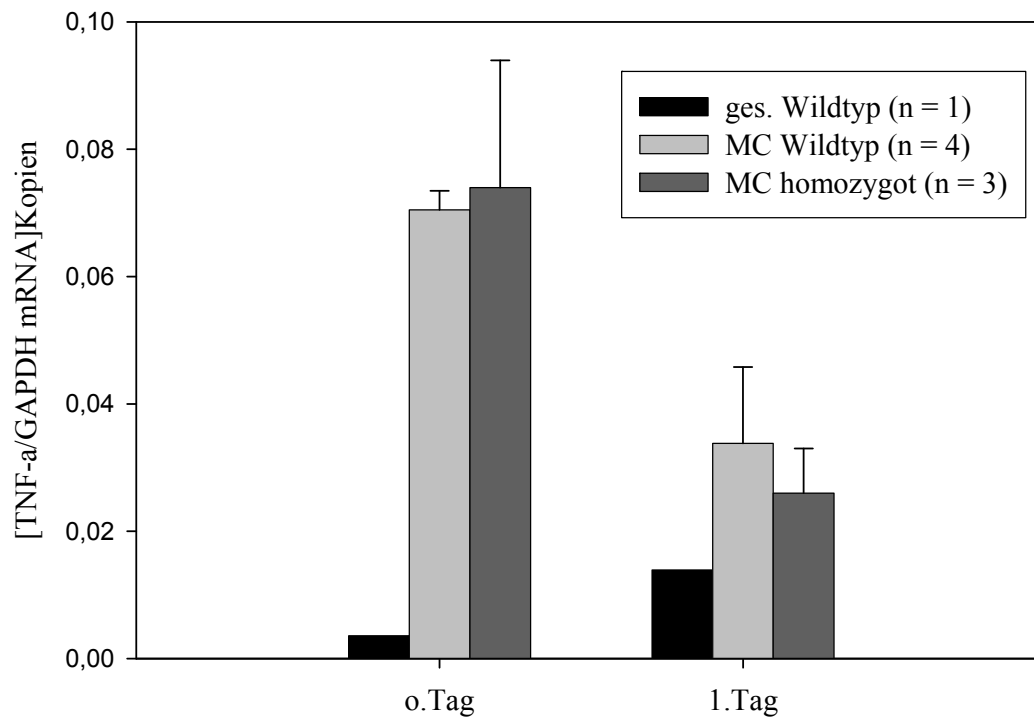
Um einen Anstieg der Zytokinexpression durch Zellkultur auszuschließen, wurden die Monozyten bei einigen Patienten unstimuliert und ohne weiteren Reiz für einen Tag auf Kultur belassen. Dabei war erkennbar, dass die mRNA-Expression der länger kultivier-

ten Zellen nicht anstieg, bei beiden Patientengruppen fielen die Werte sogar leicht ab (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.1:**

Validierungsversuch zum Einsatz der total RNA Menge für die cDNA-Synthese. GAPDH mRNA Bestimmung mittels PCR nach cDNA-Synthese unter Einsatz von je 3 Proben mit 100 ng und 1000 ng total RNA

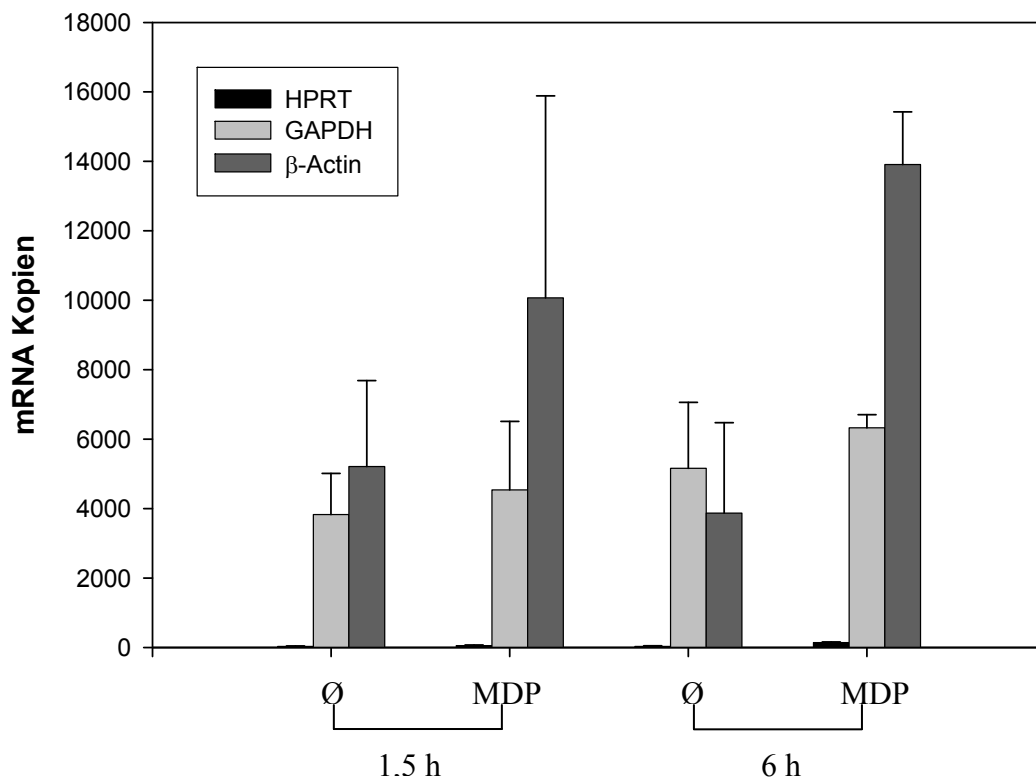


**Abbildung 4.2:**

Darstellung der TNF- $\alpha$  Expression der Monozyten von Patienten eines Teils der drei Studienpopulationen nach einem Tag Kultur.

#### 4.2.2 GAPDH als house-keeping-gene

Die Unterschiede der mRNA-Expression zwischen unstimulierten und stimulierten Monozyten waren bei keinem der getesteten *house-keeping-genes* signifikant ( $p = 0,25$  bis  $1,0$ ).  $\beta$ -Aktin zeigte die stärkste Induzierbarkeit. GAPDH stellte mit den niedrigsten Schwankungen das am besten geeignete *house-keeping-gene* dar und wurde deshalb für die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit verwendet (Abbildung 4.3).



**Abbildung 4.3:**

Vergleich der drei *house-keeping-genes* HPRT, GAPDH und  $\beta$ -Aktin bei einem gesunden Probanden. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP

## 4.3 Hauptversuche

### 4.3.1 Vorbemerkungen

Es wurden drei Studienpopulationen analysiert: 5 Patienten mit Morbus Crohn, die homozygote Träger der 3020insC-Mutation im CARD15-Gen sind, wurden zwei Kontrollgruppen gegenübergestellt: zum einen Patienten mit Morbus Crohn, zum anderen gesunde Probanden jeweils mit Nachweis des CARD15-Gens mit Wildtyp in R702W, G908R, 3020insC. Die Kopienzahlen der mRNA Expression sind in den folgenden Darstellungen auf das *house-keeping-gene* GAPDH normiert und als Mittelwert der Ratio TNF- $\alpha$ /GAPDH beziehungsweise IL-10/GAPDH dargestellt. Die Werte der Zwei- bzw. Dreifachbestimmung sind als Mittelwerte dargestellt.

Die Rohwerte der unnormierten TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expression sowie die des *house-keeping-genes* sind beispielhaft für einen homozygoten Patienten (Patient 9) im Anhang aufgeführt (Anhang: Abbildung 8.2 und 8.3).

### 4.3.2 Validität und Spezifität der PCR

Die Berechnung der mRNA-Äquivalente erfolgte anhand einer Standardkurve (Abbildung 4.4). Zur Überprüfung der Spezifität der gemessenen mRNA-Gene diente eine Schmelzkurve, die eine Auftrennung aller Doppelstrang-Edukte zur gleichen Temperatur zeigte, im aufgeführten Fall bei 80,11° C (Abbildung 4.5).

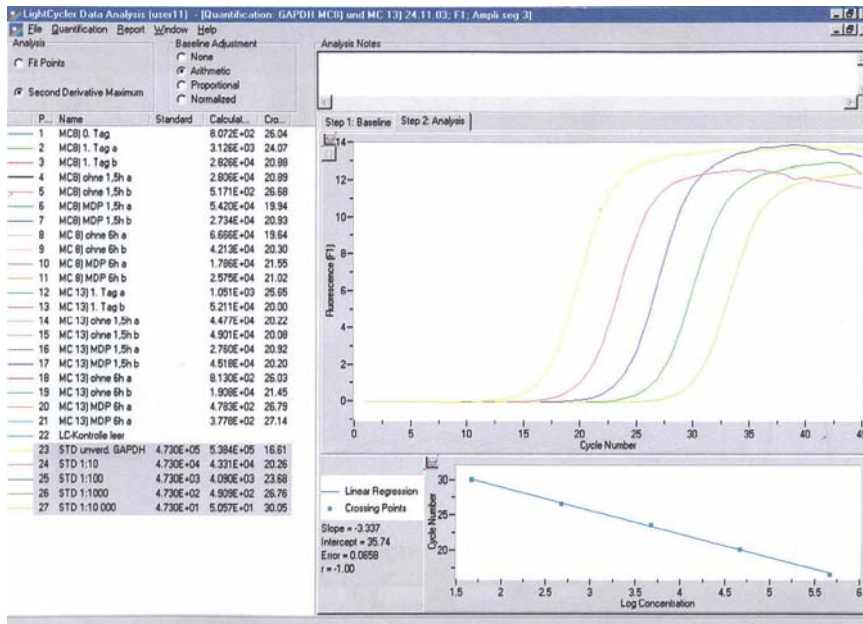


Abbildung 4.4:  
Standardkurve

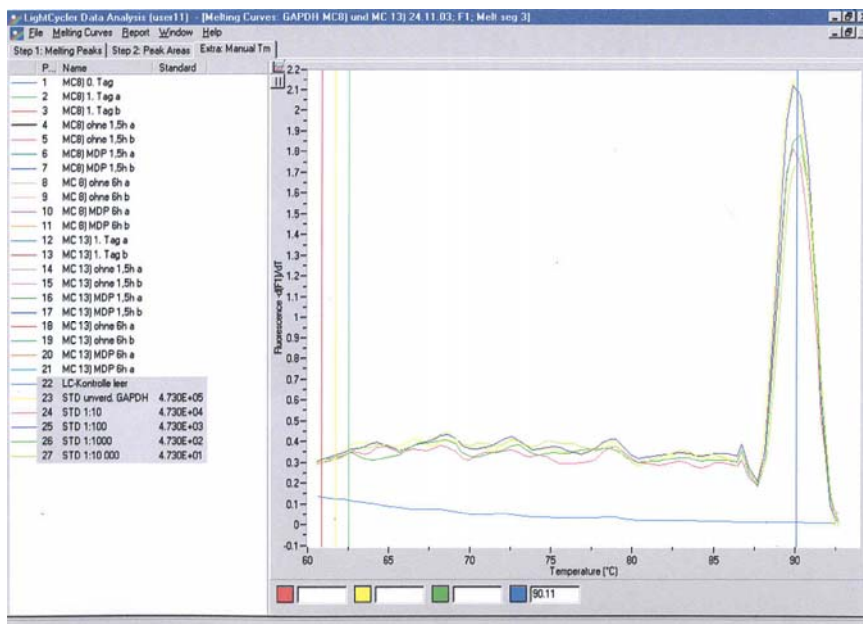
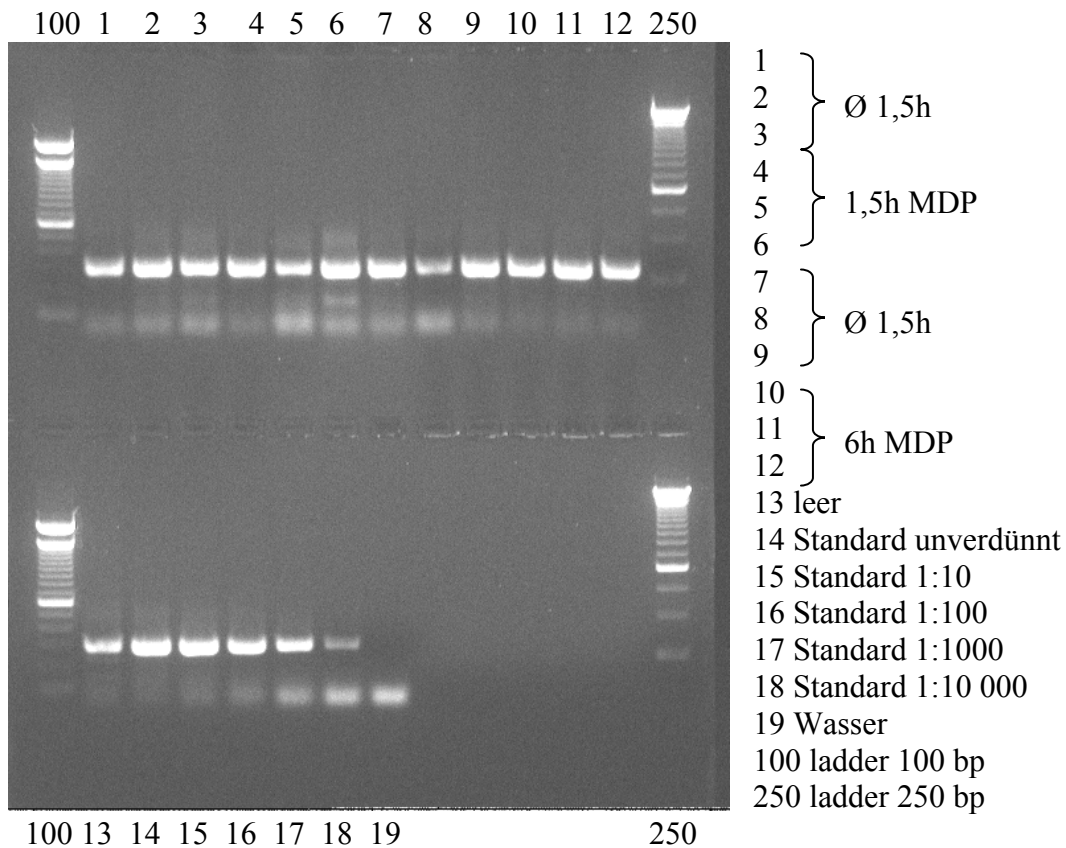


Abbildung 4.5:  
Schmelzkurve, Schmelztemperatur bei 80,11° C

### 4.3.3 Gelelektrophorese



**Abbildung 4.6:**

Gelelektrophorese der IL-10 PCR Produkte eines gesunden Wildtyp Probanden

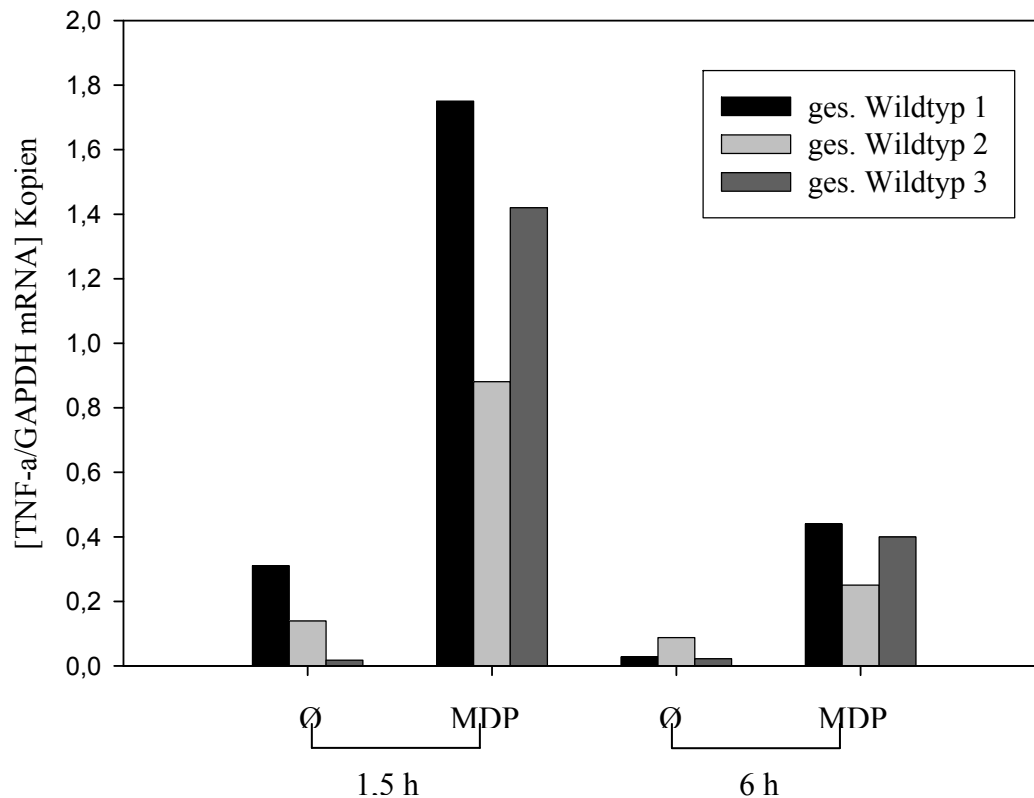
Durch die an allen Proben durchgeführte Elektrophorese der RT-PCR-Produkte konnte die Spezifität der nachgewiesenen Gene bestätigt werden. Abbildung 4.6 zeigt die Gelelektrophorese der IL-10 PCR-Produkte eines gesunden Wildtyp Probanden sowie die Standardverdünnungsreihe von IL-10. Dabei war bei allen IL-10 Produkten bei einem Molekulargewicht von etwa 300 bp eine deutliche Bande sichtbar. Durch das Vorliegen nur einer Bande bei allen durchgeführten Elektrophorese-Läufen konnte so die Spezifität des jeweils bestimmten Gens nachgewiesen werden. Bei der sichtbaren Bande im unteren Molekulargewichtsbereich handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Primerdimere.

#### 4.3.4 MDP-induzierte TNF- $\alpha$ mRNA-Expression bei Wildtyp im CARD15 Gen

Nach Stimulation der Monozyten mit dem bakteriellen Bestandteil MDP konnten in den drei Gruppen Gemeinsamkeiten und Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression festgestellt werden, die im Folgenden dargestellt werden.

**Wildtyp gesund:** Abbildung 4.6 zeigt die normierten Werte jedes einzelnen gesunden Probanden mit Wildtyp in CARD15 (Ausschluss der drei häufigsten Mutationen R702W, G908R, 3020insC). Es zeigte sich bei allen drei Probanden ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression nach 1,5 Stunden Stimulation mit MDP im Gegensatz zu den Werten ohne MDP-Zusatz. Dieser Anstieg war nicht signifikant ( $p = 0,250$ ). Nach sechs Stunden Stimulation war dieser Anstieg klar erkennbar, jedoch im Vergleich zur Expression nach 1,5 Stunden weniger stark ausgeprägt und nicht signifikant ( $p = 0,435$ ) (Abbildung 4.6 und Anhang: Tabelle 8.1).

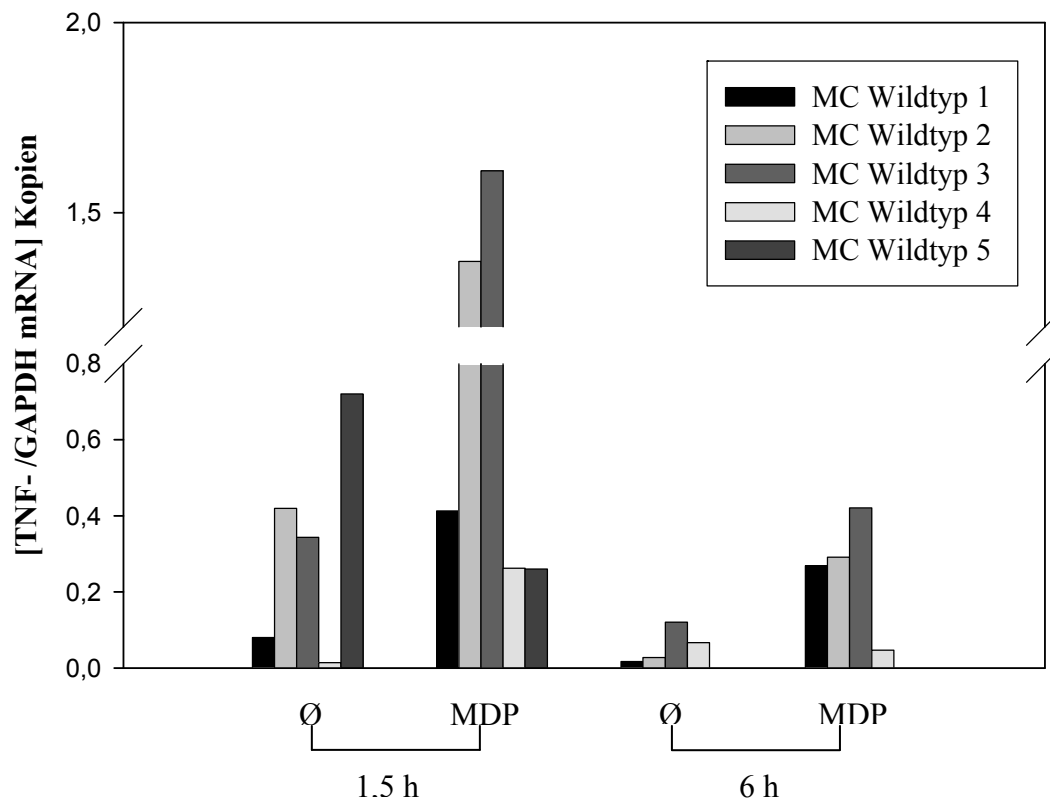




**Abbildung 4.6:**

MDP induzierte Expression von TNF- $\alpha$  mRNA bei gesunden Probanden (n=3) mit Wildtyp für R702W, G908R, 3020insC. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP

**Wildtyp Morbus Crohn:** Ein ähnlicher Effekt auf den MDP Stimulus konnte jeweils bei den Patienten mit Morbus Crohn mit Wildtyp in CARD15 (Ausschluss der Mutationen R702W, G908R und 3020insC) festgestellt werden. Nach Stimulation mit MDP war bei den Patienten mit Morbus Crohn 1 bis 4 eine deutlich höhere TNF- $\alpha$  Expression zu erkennen als ohne Stimulation. Dieser Anstieg war nicht signifikant, und nach 1,5 Stunden Stimulation ( $p > 0,2$ ) deutlich stärker ausgeprägt als nach 6 Stunden ( $p = 0,091$ ). Bei Morbus Crohn Patient 5 war der Anfangswert ohne Stimulation höher als nach Stimulation (Abbildung 4.7, Anhang: Tabelle 8.1).



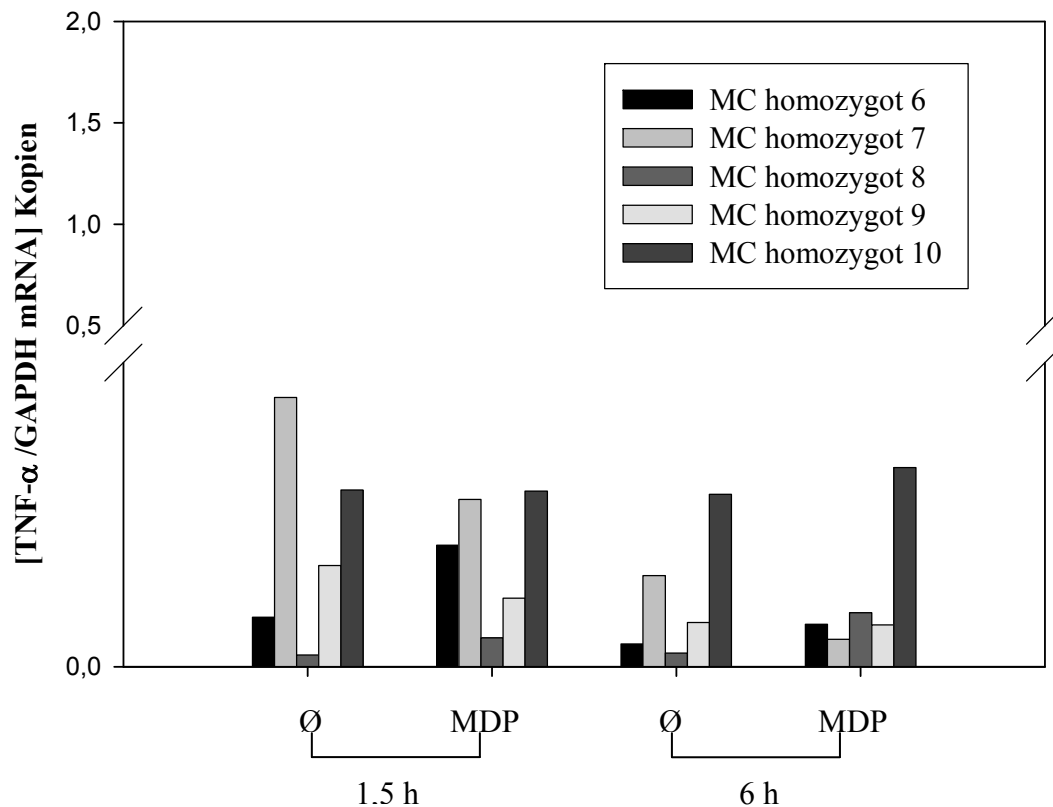
**Abbildung 4.7:**

MDP induzierte Expression von TNF- $\alpha$  mRNA bei Patienten mit Morbus Crohn (n=5) mit Wildtyp für R702W, G908R, 3020insC. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP, MC = Morbus Crohn Patient

#### 4.3.5 MDP-induzierte TNF- $\alpha$ mRNA-Expression bei homozygoter 3020insC-Mutation im CARD15 Gen

Im Gegensatz zu den beiden aufgeführten Wildtyp Populationen (Gesunde und Patienten mit Morbus Crohn), zeigte sich bei den für die 3020insC-Mutation in CARD15 homozygoten Patienten mit Morbus Crohn kein Effekt: nach 1,5 sowie nach 6 Stunden Stimulation mit MDP war bei diesen Patienten kein Anstieg der TNF- $\alpha$  mRNA Expression zu erkennen. Bei den Patienten 7 und 9 war die TNF- $\alpha$  mRNA Kopienzahl mit MDP-Stimulation jeweils sogar etwas niedriger als ohne Stimulation. Ausschließlich bei Patient 1 war sowohl nach 1,5 wie auch nach 6 Stunden Stimulation ein leichter

Anstieg der TNF- $\alpha$ -Expression zu erkennen. Die Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen waren nicht signifikant (Abbildung 4.8, Anhang, Tabelle 8.1).

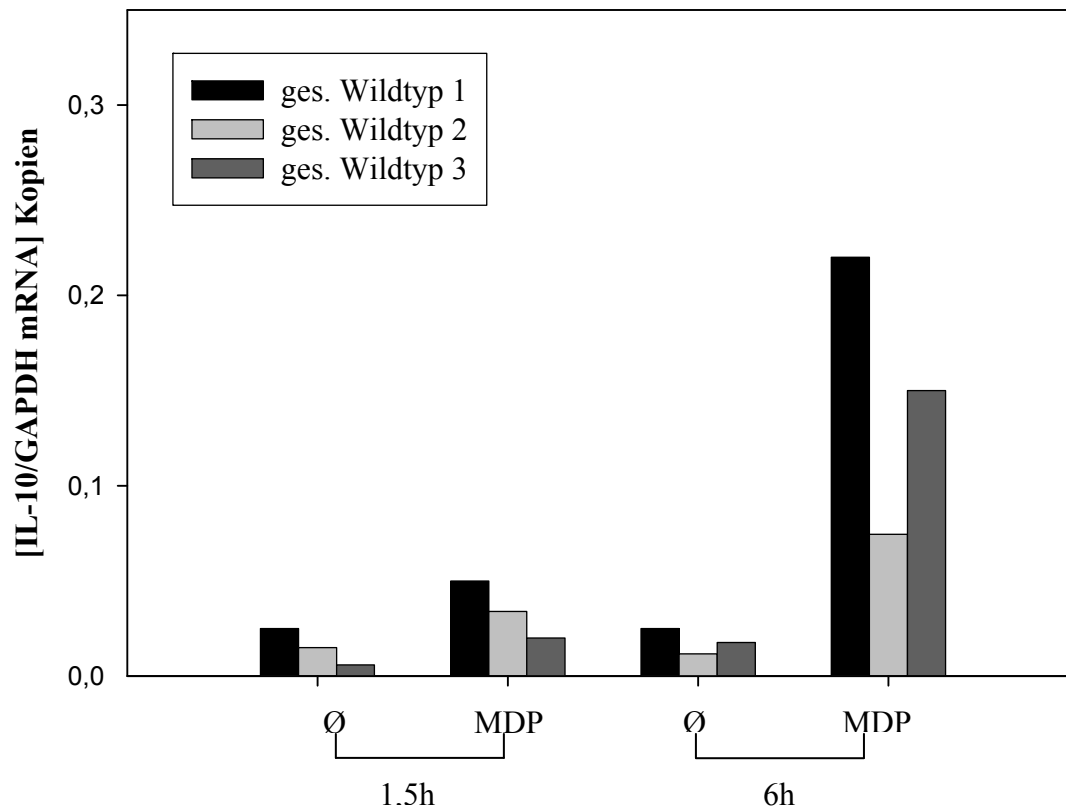


**Abbildung 4.8:**

MDP induzierte Expression von TNF- $\alpha$  mRNA bei Patienten mit Morbus Crohn (n=5), homozygot für 3020insC in CARD15. 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 Patient

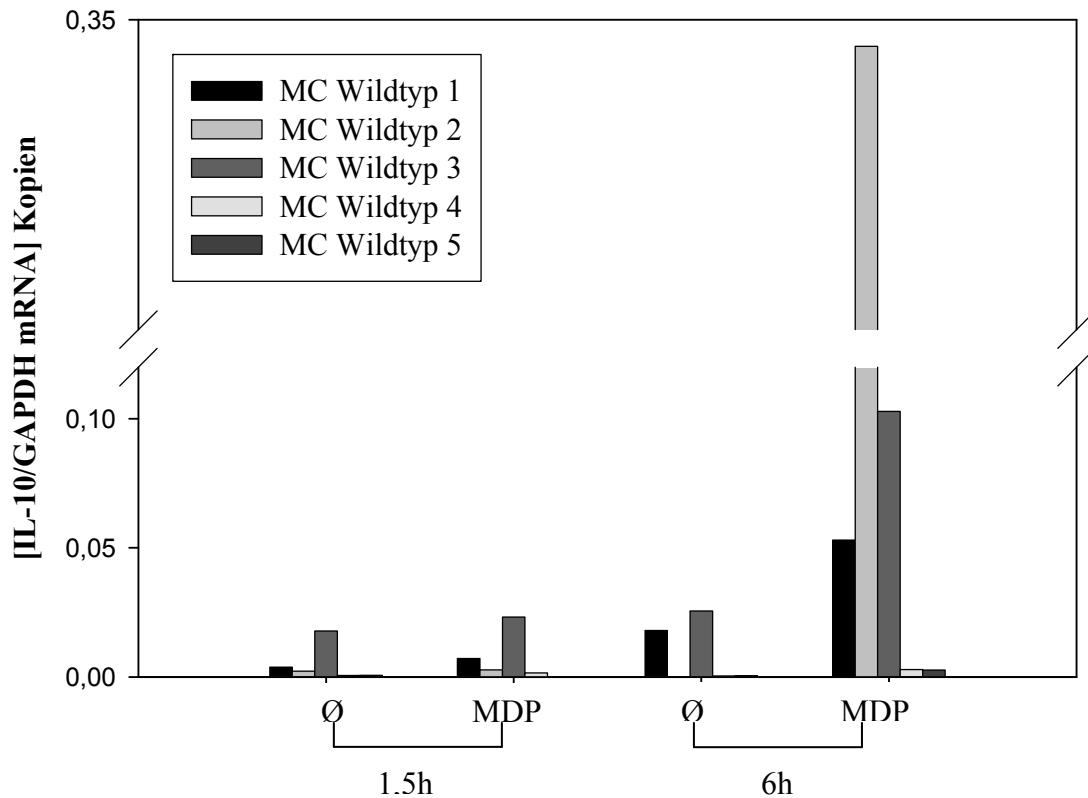
#### 4.3.6 MDP-induzierte IL-10 mRNA-Expression bei Wildtyp im CARD15 Gen

Einen ähnlichen Effekt wie bei den TNF- $\alpha$  Messungen ergaben die Bestimmungen der IL-10 mRNA. Die beiden Wildtyp-Kollektive (Gesunde und Patienten mit Morbus Crohn) zeigten auf den MDP Reiz einen deutlichen, nicht signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von IL-10 (Abbildungen 4.9 und 4.10).



**Abbildung 4.9:**

MDP induzierte Expression von IL-10 mRNA bei gesunden Probanden (n=3) mit Wildtyp für R702W, G908R, 3020insC. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP, ges. = gesund

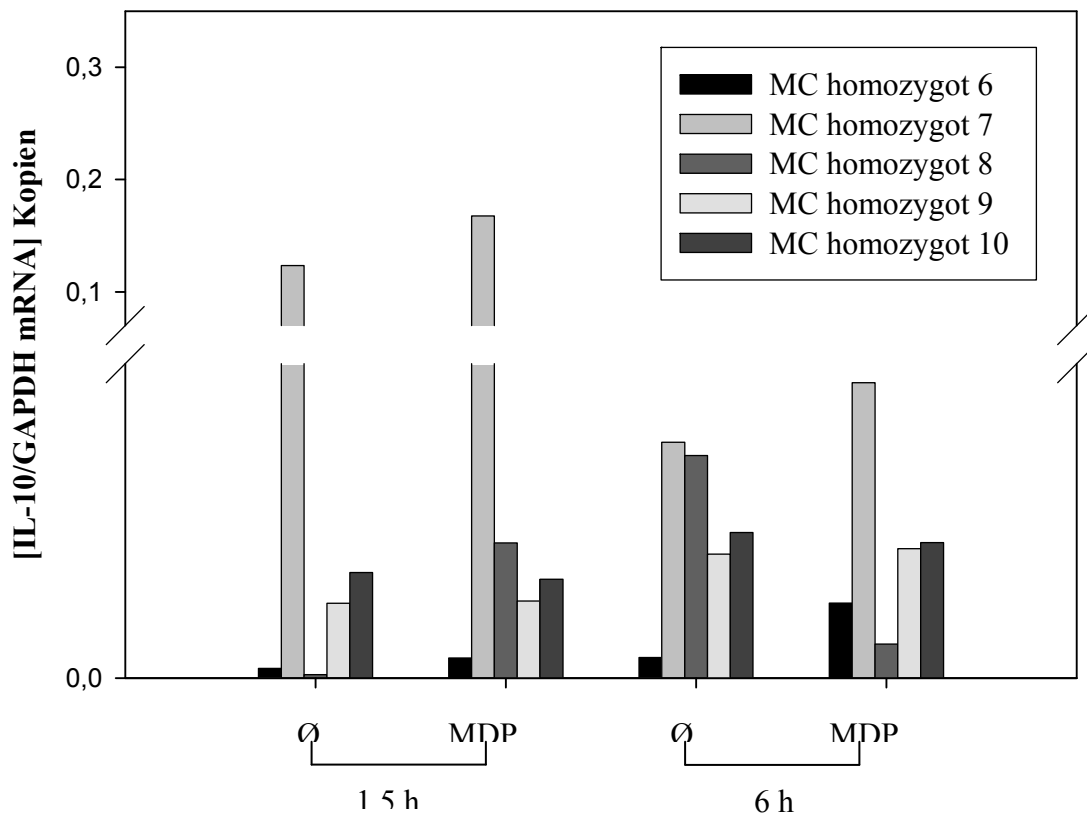


**Abbildung 4.10:**

MDP induzierte Expression von IL-10 mRNA bei Patienten mit Morbus Crohn (n=5) mit Wildtyp für R702W, G908R, 3020insC. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP, MC = Morbus Crohn Patienten

### 4.3.7 MDP-induzierte IL-10 mRNA – Expression bei homozygoter 3020insC-Mutation im CARD15 Gen

Patienten mit Morbus Crohn mit homozygoter 3020insC Mutation hingegen zeigten keine vermehrte Expression von IL-10 mRNA nach Stimulation mit MDP (Abbildung 4.11).



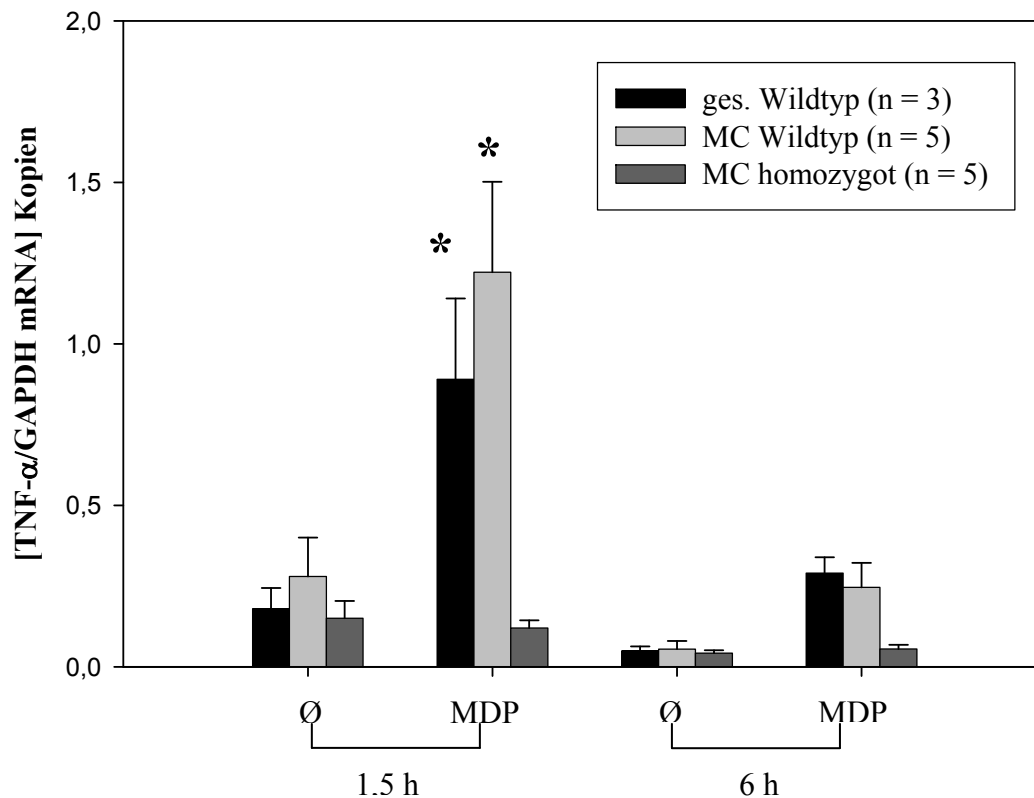
**Abbildung 4.11:**

MDP induzierte Expression von IL-10 mRNA bei Patienten mit Morbus Crohn (n=5) mit homozygoter 3020insC-Mutation. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP, MC = Morbus Crohn Patienten

Im Vergleich zu den TNF- $\alpha$  Messungen waren folgende Unterschiede erkennbar: Die IL-10 mRNA Kopienzahlen lagen sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Monozyten deutlich unter denen der TNF- $\alpha$  Kopienzahl. Durch die Normierung mit den relativ höheren GAPDH mRNA-Werten lagen die Ratios somit bei den Patienten 4, 5 und 2 unstimuliert unter der Darstellungsgrenze und erscheinen in Abbildung 4.10 als Nullwert. Außerdem war der Anstieg der IL-10 mRNA-Expression der Wildtyp-Kollektive nach 6 Stunden Stimulation mit MDP deutlich, im Gegensatz zur TNF- $\alpha$  mRNA-Expression, die nach 1,5 Stunden eine klare Zunahme gezeigt hatte (Abbildungen 4.10 und 4.11, Anhang: Tabelle 8.2).

#### 4.3.8 MDP-induzierte TNF- $\alpha$ mRNA-Expression in Abhängigkeit des CARD15 Genotyps

Die drei Studienpopulationen wurden schließlich mittels Mann-Whitney-U Test miteinander verglichen: Dabei zeigte sich für TNF- $\alpha$ , dass bereits in der sehr frühen Phase – nämlich 1,5 Stunden nach Stimulation mit MDP – signifikante Unterschiede bezüglich der TNF- $\alpha$  mRNA-Expression zwischen den einzelnen Gruppen auftraten. Bei den homozygoten Patienten kam es sichtbar zu keinem Anstieg der TNF- $\alpha$  mRNA-Expression, während bei den Wildtyp Patienten mit Morbus Crohn (Wildtyp in CARD15 für R702W, G908R, 3020insC) wie auch bei den gesunden Kontrollen (Wildtyp in CARD15 für R702W, G908R, 3020insC) eine deutliche proinflammatorische Reaktion erkennbar war. Die Unterschiede zwischen gesunden Probanden und 3020insC homozygoten Patienten mit Morbus Crohn waren 1,5 Stunden nach Stimulation signifikant ( $p = 0,036$ ). Auch zwischen Wildtyp Patienten mit Morbus Crohn und homozygoten Patienten mit Morbus Crohn lagen nach 1,5 Stunden MDP-Stimulation signifikante Unterschiede vor ( $p = 0,008$ ). Interessant war, dass diese Unterschiede 6 Stunden nach Stimulation wesentlich geringer waren. Unterschiede zwischen den Gruppen waren zwar auch dort zu erkennen, diese waren jedoch nicht signifikant ( $p = 0,071$  bzw.  $p = 0,056$ ) (Abbildung 4.12, Anhang: Abbildung 8.1).



**Abbildung 4.12:**

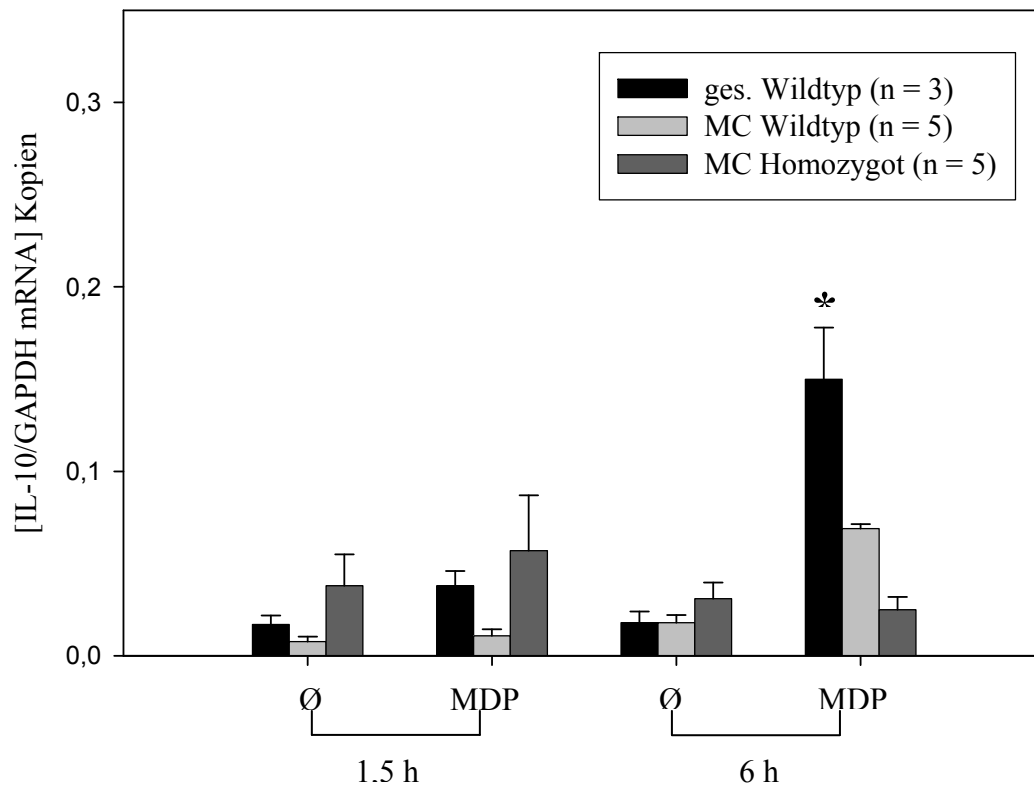
MDP induzierte Expression von TNF- $\alpha$  mRNA je nach CARD15 / NOD2 Genotyp. Kopienzahlen normiert auf das house-keeping-gene GAPDH. Bestimmung jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und nach der gleichen Kulturdauer auf Medium ohne MDP. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP, MC = Morbus Crohn; Mittelwerte  $\pm$  SEM; \*  $p < 0,05$  zwischen den einzelnen Gruppen

#### 4.3.9 MDP-induzierte IL-10 mRNA-Expression in Abhängigkeit des CARD15 Genotyps

Im Vergleich der drei Studienpopulationen zeigten sich auch für IL-10 Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für TNF- $\alpha$  traten signifikante Unterschiede jedoch erst nach 6 Stunden MDP-Stimulation auf. Bei den homozygoten Patienten kam es zu keiner Aktivierung, während bei den Wildtyp Patienten mit Morbus Crohn (Wildtyp in CARD15 für R702W, G908R, 3020insC) wie auch bei den gesunden Kontrollen wiederum eine deutliche Reaktion sichtbar war. Die Unterschiede zwischen den gesunden Probanden mit Wildtyp und den 3020insC



homozygoten Patienten mit Morbus Crohn war nach 6 Stunden Stimulation signifikant ( $p = 0,036$ ) (Abbildung 4.13, Anhang: Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.13:**

MDP induzierte Expression von IL-10 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; \*  $p < 0,05$

#### **4.4 Phänotyp – Genotyp**

Im Vergleich der Krankheitsmanifestation beider Patientengruppen zeigten sich folgende Tendenzen: Homozygote Träger der 3020insC Mutation waren im Durchschnitt bei Diagnosestellung eines Morbus Crohns jünger, litten häufiger unter einem Befall von mehr als einem Darmabschnitt und benötigten häufiger eine Morbus Crohn assoziierte chirurgische Intervention als Patienten ohne Mutation. Bei allen Patienten mit Mutation, aber bei nur einem der fünf Patienten ohne Mutation, war das Ileum befallen. Vier der fünf Patienten ohne Mutation zeigten dagegen einen isolierten Befall des Kolons, was bei keinem der Patienten mit Mutation festzustellen war. Hinsichtlich der Therapie bestanden keine auffälligen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:**

Krankheitsverlauf der Patienten mit Morbus Crohn je nach Genotyp;

\* = auffälliger Unterschied bei Vergleich zwischen den Gruppen

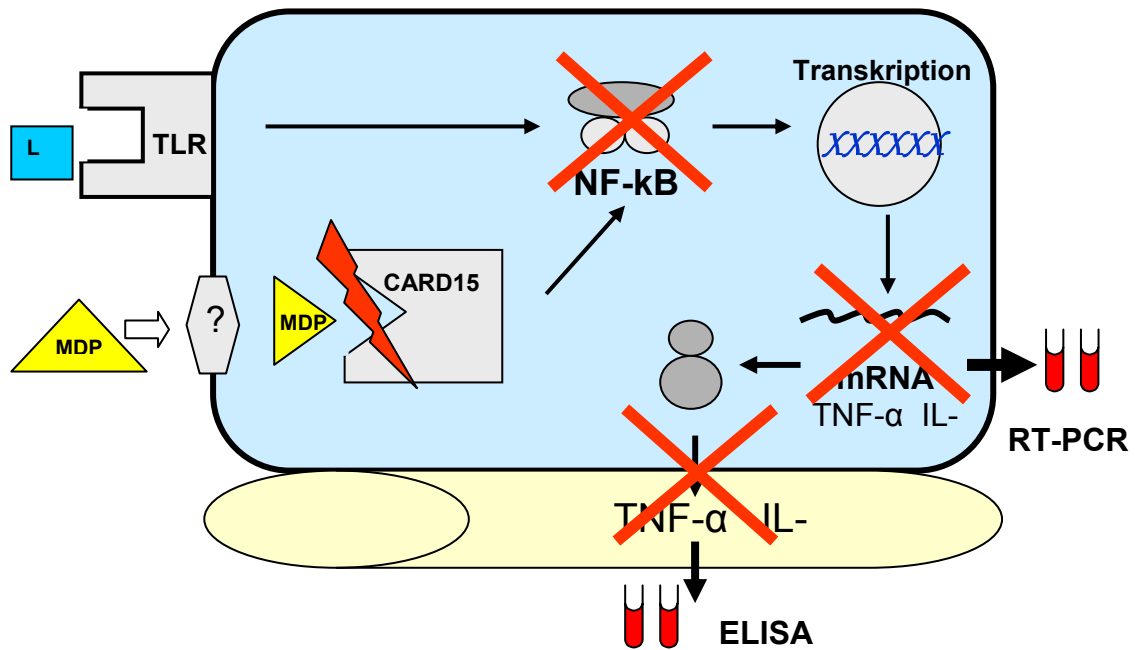
	<b>M.Crohn Homozygot</b> N = 5	<b>M.Crohn Wildtyp</b> n = 5
mittleres Alter bei Diagnose (Jahre)	<b>29,6*</b>	32,8
<b>Lokalisation:</b>		
Anzahl betroffener Darmabschnitte (Mittelwert)	<b>2,6*</b>	1,2
Terminales Ileum	<b>5 (5)*</b>	1 (5)
Kolon	4 (5)	5 (5)
Rektum	2 (2)	2 (2)
<b>Komplikationen:</b>		
Insgesamt	<b>4 (5)*</b>	2 (5)
Fisteln	<b>3 (5)*</b>	0 (5)
Stenosen	3 (5)	2 (5)
Abszess	1 (5)	0 (5)
<b>Chirurgische Intervention (Crohn assoziiert):</b>		
Anzahl Patienten	3 (5)	2 (5)
Anzahl der Eingriffe (Mittelwert)	<b>4,7*</b>	2,5
<b>Therapie:</b>		
Azathioprin	3 (5)	3 (5)
5-ASA	4 (5)	3 (5)
Orale Glukokortikoide	3 (5)	4 (5)

## 5 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie wurde erstmals die Auswirkung der 3020insC Mutation im CARD15-Gen auf die *ex vivo* Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA in Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Gesunden nach spezifischer Stimulation mit dem bakteriellen CARD15-Erkennungsmolekül MDP beurteilt.

Eine Stimulation mit bakteriellem MDP führte bei Monozyten von drei gesunden Probanden und von fünf Patienten mit Morbus Crohn jeweils mit Wildtyp im CARD15-Gen zu einem deutlichen Anstieg der Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA. Das Verhalten der Monozyten dieser Patienten unterschied sich signifikant von der Reaktion der Monozyten von fünf Patienten mit Morbus Crohn mit nachgewiesener homozygoter 3020insC Mutation im CARD15 Gen, bei denen kein Anstieg einer Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA nachgewiesen werden konnte. Das untersuchte Expressionsprofil zeigte hier keinen Unterschied zu unstimulierten Zellen (Abbildung 5.1).

Des Weiteren konnte zwischen den Patientengruppen mit und ohne Mutation eine phänotypisch unterschiedliche Krankheitsausbildung aufgezeigt werden. Die Patienten mit Mutation waren bei Diagnosestellung jünger, zeigten häufiger einen komplikationsreichen Verlauf mit Fisteln und Stenosen und wurden häufiger operiert als Patienten ohne Mutation. Bei allen homozygoten Patienten war das terminale Ileum betroffen, Patienten ohne Mutation wiesen eher einen isolierten Befall des Kolons auf.



**Abbildung 5.1:**

Schematische Darstellung der extrazellulären und intrazellulären Aktivierung durch bakterielle Bestandteile (LPS, MDP). Dargestellt ist die defekte intrazelluläre Aktivierung des verkürzten CARD15 Rezeptors bei 3020insC-mutiertem CARD15 Gen.

Diese Erkenntnisse tragen wesentlich zum besseren Verständnis der komplexen Immunpathogenese des Morbus Crohn bei. Dass die gefundenen Ergebnisse nur im Gesamtzusammenhang der Literatur zu beurteilen sind und dass eine solche experimentelle Untersuchung verschiedene Fehlerquellen und Limitationen aufweist, liegt auf der Hand und soll im Folgenden diskutiert werden.

## 5.1 **Diskussion von Studiendesign und Methoden**

### *Studiendesign*

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive *ex vivo* Studie. Vorteile dieses Studiendesigns lagen neben einer genauen Planbarkeit in der Ähnlichkeit der Studienbedingung zur physiologischen Situation. Dies ist bei bisher vorwiegend durchgeführten *in vitro* Studien oder Mausmodellen nicht der Fall, da beispielsweise mit CARD15 transfizierte Nierenzellen keine TLRs tragen (29, 62) und das humane Immunsystem von dem der Maus erheblich differiert (73). Durch Herstellung klar abgegrenzter Bedingungen und Fragestellungen waren dennoch spezifische Funktionsuntersuchungen möglich. Ein weiterer Vorteil lag in der nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit des Materials, also der Monozyten, was für Nachmessungen oder Kontrollversuche nützlich war.

Die Übertragbarkeit der erzielten *ex vivo* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation sollte allerdings trotzdem stets im Rahmen anderer Studienergebnisse geprüft werden, da teilweise Bedingungen hergestellt werden mussten, deren Übertragbarkeit in die physiologische Situation unklar ist. Hier sei beispielsweise die lange Stimulation mit hochkonzentrierten Mengen an MDP aufgeführt (bis zu 6 h mit 100 ng/ml MDP). Im Vergleich zu vorangegangenen Studien ist dies jedoch niedrig. Diese Studien fanden signifikante Unterschiede erst bei höheren MDP Konzentrationen (1-100 µg/ml) (29, 90, 98) oder längerer Stimulationsdauer (bis 16 Stunden) (50). Dass die in der vorliegenden Untersuchung verwendete niedrige MDP Konzentration der physiologischen Situation näher zu sein scheint, zeigen Studien mit den beiden weniger häufigen Mutationen Arg702Trp und Gly908Arg. Hier war eine Induktion mit hohen MDP Konzentrationen herbeizuführen, nicht aber durch niedrige, während die 3020insC Mutation in jedem Fall einen kompletten Funktionsverlust zeigte (50). Obwohl die Funktion des CARD15-Proteins als MDP-Rezeptor in zahlreichen Studien bewiesen wurde (29, 44), konnte die direkte

und spezifische Bindung von MDP an das CARD15-Protein bisher noch nicht nachgewiesen werden. Der Mechanismus der MDP-Erkennung wird in Nachfolgeuntersuchungen untersucht werden müssen, um eine weitere Annäherung an die physiologische Situation erreichen zu können.

### *Studienpopulation*

In der vorliegenden Studie handelt es sich um eine so kleine Studienpopulation, dass signifikante Unterschiede nicht erwartet wurden. Der nachgewiesene Anstieg der mRNA-Expression bei Monozyten von Wildtypen war deutlich (Abbildungen 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11), im Wilcoxon-Test jedoch nicht signifikant (Anhang: Tabellen 8.1, 8.2). Dies kann einerseits auf die kleine Untergruppengröße der Studienpopulation, als auch auf „Ausreißer“ wie Wildtyp-Patient 5, bei dem eine höhere TNF- $\alpha$  mRNA-Expression ohne Stimulation gefunden wurde (Abbildung 4.7), zurückgeführt werden. Plausible Ergebnisse lieferten die Signifikanzen zwischen den Studiengruppen im Mann-Whitney-U-Test, durch welche die Auswirkung der homozygoten 3020insC-Mutation in CARD15 in einer verminderte Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA in Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Patienten und Probanden ohne Mutation nachgewiesen werden konnten.

### *Zellseparation und Monozytenisolation*

Die Auswahl der geeigneten Isolationsmethode war zum Erreichen einer guten Reinheit der Monozyten und zum Vermeiden einer unspezifischen Stimulation der Monozyten von essentieller Bedeutung. Bei den vor Studienbeginn getesteten verschiedenen Methoden war die Reinheit der Monozyten bei indirekter Zellisolation mittels MACS mit etwa 85 % im Gegensatz zu den Verfahren mittels Adhärenzmethode und Percoll-Dichtezentrifugation am Besten. Die Vorteile der Monozytenisolation mittels MACS lagen außerdem in einer schnellen und sehr spezifischen Separation. Von einer niedrigeren Aktivierung von Immunzellen bei Isolation mittels MACS im Vergleich zur Isola-

tion durch Dichtezentrifugation wurde schon früher berichtet (101). Ein entscheidender Vorteil der in der vorliegenden Studie angewandten negativen Zelldifferenzierung 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 (12). Dies ist insbesondere für funktionelle Studien und bei Antigen-Aufnahme durch die Monozyten, wie bei der vorliegenden Studie der Fall, von entscheidender Bedeutung.

Nachteile gegenüber anderen Methoden sind magnetische Interaktionen, die zu Kreuzreaktionen der Antikörper mit den Monozyten führen können und sich störend auf die Separation auswirken können. Außerdem ist die Zellzahl aufgrund der Kapazität der Röhren begrenzt (55). Insgesamt scheint die etwas aufwändigere negative Zelldifferenzierung jedoch die bislang vorteilhafteste Methode für funktionelle Studien zu sein.

#### *RNA-Isolierung*

Das Arbeiten mit RNA stellt eine Herausforderung dar, da stets die Gefahr des RNA-Verdau durch die allgegenwärtigen RNAsen besteht. Um dies zu vermeiden, wurde strikt unter sterilen Bedingungen gearbeitet, und die Proben wurden bis kurz vor Durchführung der Versuche auf  $-80^{\circ}\text{C}$  beziehungsweise auf Eis gelagert. Hier bietet die RNA-Isolierung nach der Qiagen Methode einen entscheidenden Vorteil, da der stark denaturierende RLT-Puffer die RNAsen sofort inaktiviert und damit eine Isolation intakter total RNA sicherstellt. Ein weiterer positiver Effekt der Qiagen-Methode ist die selektive Bindung von RNA mit mehr als 200 Nukleotiden (mRNA) auf der Silica-Gel-Membran mit Extraktion von RNA, die kürzer als 200 Nukleotide ist (rRNA, 5S RNA, tRNA, insgesamt 15-20 % der total RNA). Eine Limitierung dieser Methode stellt die begrenzte Bindungskapazität dar, die maximal  $1 \times 10^7$  Zellen bzw. 100  $\mu\text{g}$  RNA trägt. Wird diese Kapazität überschritten, ist der Ertrag der total RNA nicht konsistent, und es



kann sein, dass weniger als 100 µg total RNA gewonnen werden. Auch im Fall einer inkompletten Lyse der Monozyten kann die Ausbeute der total RNA geringer sein als erwartet, auch wenn die Bindungskapazität nicht überschritten wurde (70, 75).

#### *cDNA Synthese/„house-keeping-genes“*

Zur Validierung und Standardisierung der cDNA-Synthese mit nachfolgender RT-PCR werden üblicherweise „house-keeping-genes“ verwendet. Optimalerweise sind dies Gene, die nicht durch äußere Faktoren beeinflusst werden und deshalb als Normwert der Genexpression der Zelle dienen können. Für die vorliegende Untersuchung stellte sich GAPDH aufgrund der geringsten, nicht signifikanten MDP abhängigen Schwankungen im Vergleich zu HPRT und  $\beta$ -Actin als am besten geeignet heraus (Abbildung 4.2). Eine leichte Induzierbarkeit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Diese Erkenntnisse stimmen mit früheren Untersuchungen zu diesem Thema überein (25, 31).

Durch Bestimmung der Expression des „house-keeping-genes“ konnte in der vorliegenden Studie des Weiteren das Überleben der Zellen bewiesen werden: Bei erniedrigter oder fehlender mRNA Expression der „genes of interests“ schloss eine gleich bleibend hohe Expression des „house-keeping-gene“ den Tod der Zelle aus (Anhang: Abbildung 8.2).

In der Validierung der eingesetzten total RNA Mengen wurde festgestellt, dass bei Einsatz eines Zehntels von 1000 ng total RNA (100 ng) nach cDNA Synthese in der RT-PCR bei den 100 ng-Proben im Vergleich zu den 1000 ng-Proben 1/6 der mRNA Kopien exprimiert wurde (Abbildung 4.1). Diese vermehrte Expression bei einem Einsatz von weniger Menge könnte mit einer verstärkten cDNA-Synthese zusammenhängen, ist aber nicht gänzlich geklärt.

#### *RT-PCR*

Die *Real-time Polymerase-Chain-reaction* (RT-PCR) mittels LightCycler stellt eine moderne Methode zur zuverlässigen und exakten Quantifizierung spezifischer mRNA

dar. Voraussetzung für einen zuverlässigen quantitativen Nachweis ist eine funktionierende mRNA Analytik, die exakte mRNA Quantifizierungsergebnisse bei ausreichender Genauigkeit und hoher Wiederholbarkeit liefert. Eine gute Reproduzierbarkeit mit hoher Sensitivität und Spezifität konnte für die quantitative RT-PCR mittels LightCycler auch im Vergleich zu anderen RT-PCR-Verfahren nachgewiesen werden (83). Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die Zytokin-mRNA-Expression nicht immer mit der Menge an Protein korreliert (74). Eine mögliche Diskrepanz zwischen gemessener mRNA-Expression und sezerniertem Protein könnte durch verschiedene post-transkriptionelle und post-translationelle Faktoren beeinflusst sein (66). Verschiedene Publikationen haben jedoch eine gute Korrelation von über RT-PCR gemessenen Zytokin-mRNA-Leveln und durch ELISA determinierter Proteinmenge gezeigt (35, 96), die auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte (88). Im Bezug auf die Zytokin-Biologie ergeben sich für den quantitativen Nachweis von mRNA im Gegensatz zum Nachweis von Proteinen folgende Vorteile: Die meisten Zytokine werden in sehr geringen Mengen produziert, besitzen eine niedrige Halbwertszeit und nach ihrer Freisetzung erfolgt eine schnelle Utilisation nach autokriner oder parakriner Übertragung bei Zell-zu-Zell-Kontakt (74). Deshalb könnten die gebildeten Proteine bei Messung womöglich nicht erkannt werden, wohl aber ihre Vorstufe, die mRNA.

## **5.2 CARD15-abhängige MDP induzierte Expression von TNF- $\alpha$ und IL-10**

### **5.2.1 Verstärkte MDP-induzierte mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ bei Wildtyp**

Durch Stimulation mit MDP konnte bei den Monozyten aller untersuchten Patienten bzw. Probanden, bei denen genotypisch ein CARD15-Wildtyp nachgewiesen wurde, ein Anstieg der Expression von TNF- $\alpha$ -mRNA induziert werden. Die verstärkte Expression dieser Monozyten war zwar statistisch nicht signifikant (Anhang: Tabelle 8.1), konnte aber grundsätzlich bei allen entnommenen Proben aller Patienten als sehr deutliche Tendenz festgestellt werden. Die fehlende Signifikanz der Induzierbarkeit kann durch die kleine Studienpopulation erklärt werden.

Sowohl Monozyten gesunder Probanden als auch die von Patienten mit Morbus Crohn mit CARD15-Wildtyp scheinen also auf den Reiz der MDP-Stimulation mit einer Überexpression von TNF- $\alpha$ -mRNA zu reagieren.

### **5.2.2 Verstärkte MDP-induzierte mRNA-Expression von IL-10 bei Wildtyp**

Auch bei IL-10 mRNA konnte durch Stimulation mit MDP eine starke Überexpression festgestellt werden, die gegenüber den unstimulierten Werten nicht signifikant, aber deutlich erkennbar war.

Interessant ist die Feststellung, dass MDP-stimulierte Monozyten mit CARD15 Wildtyp nach 1,5 Stunden Stimulation einen *peak* der TNF- $\alpha$  mRNA-Expression aufweisen, während die Werte nach 6 Stunden Stimulation wieder auf unstimuliertes Niveau abfallen. Die Tatsache, dass IL-10 mRNA erst 6 Stunden nach Stimulation einen Anstieg

der Expression zeigt, lässt einen antiinflammatorischen Gegenregulatismus vermuten (81).

### **5.2.3 Verminderte MDP-induzierte mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ und IL-10 in 3020insC homozygoten Patienten mit Morbus Crohn**

Im Gegensatz zu den Wildtyp Patienten und Probanden führte eine Stimulation mit MDP bei Patienten mit Morbus Crohn und nachgewiesener homozygoter 3020insC-Mutation im CARD15-Gen zu keiner Verstärkung einer Expression von TNF- $\alpha$  bzw. IL-10 mRNA. Die Ergebnisse der homozygoten Patienten unterschieden sich damit signifikant von den beiden untersuchten Wildtyp-Gruppen. Durch das Vorliegen einer solchen Mutation scheinen Monozyten also die Fähigkeit, MDP zu erkennen und/oder auf diesen Reiz zu reagieren zu verlieren.

### **5.2.4 Diskussion der eigenen Ergebnisse mit gegenwärtiger Literatur**

In der vorliegenden Studie konnte erstmals demonstriert werden, dass Monozyten von 3020insC homozygoten Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Wildtyp Kontrollen eine signifikant erniedrigte transkriptionale Antwort (TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA) auf MDP haben (Abb.4.10 und 4.11). Die erhobenen Daten sind mit der *in vitro* bislang hauptsächlich überprüften fehlenden Aktivierung des NF- $\kappa$ B Systems bei 3020insC homozygoter Mutation vereinbar (63). In nachfolgenden Studien, die einen Defekt in der TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 und IL-10 Produktion beschrieben, wurden die in der vorliegenden Studie dargestellten Ergebnisse bestätigt (52, 60, 92). Diese Ergebnisse resultieren höchst wahrscheinlich aus dem durch die 3020insC Mutation verursachten Verlust von CARD15, Peptidoglykan Komponenten über seine C-terminale LRR Domäne zu erkennen.

### *CARD15-Funktion*

Die hier dargestellten Ergebnisse belegen die Funktion des CARD15-Proteins, als Erkennungsmolekül zu fungieren (8) und sind konform mit der festgestellten Wirksamkeit von MDP, das NF- $\kappa$ B System über CARD15-Transduktion zu aktivieren (29, 44). Darüber hinaus zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass humane Monozyten wahrscheinlich über keine Signal-Transduktionswege für MDP verfügen (z.B. über TLRs), die unabhängig des CARD15-Proteins funktionieren.

### *Downstream*

Weiterführend zeigen vorliegende Ergebnisse, dass die Mutation Vorgänge beeinflusst, die dem NF- $\kappa$ B-System nachgeschaltet sind. Neben der mRNA Ebene von TNF- $\alpha$  und IL-10 wurde in einer Kooperationsarbeit bei denselben Zellen die Sekretion der entsprechenden Proteine überprüft. Auch hier konnte bei Monozyten homozygoter Patienten eine erniedrigte Aktivierbarkeit durch MDP im Gegensatz zu Wildtyp-Kontrollen festgestellt werden (88). Die Ergebnisse der Proteinsekretion korrelierten mit den hier dargestellten Daten der mRNA-Expression. Dies war in einer früheren Untersuchung, in der MDP einen Einfluss auf die Expression von TNF- $\alpha$  mRNA, nicht jedoch auf die Sekretion von TNF- $\alpha$  Proteinen hatte, nicht der Fall (98). Weiterführende Studien, die sowohl die mRNA als auch die Proteinebene behandeln, sind zur endgültigen Klärung dieser Diskrepanz nötig. Die Feststellung, dass die Mutation Einfluss auf Prozesse hat, die dem NF- $\kappa$ B System nachgeschaltet sind, ist aufgrund der strengen Regulation des *downstreams* entscheidend (91) und zeigt, dass die kürzlich beschriebene verringerte Induktion von NF- $\kappa$ B nach MDP-Stimulation zu einer verminderten Transkription, Translation und Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine führt. Basierend auf dem deutlich stimulatorischen Effekt von MDP in Monozyten gesunder Probanden und Patienten mit Morbus Crohn mit Wildtyp kann darauf geschlossen werden, dass die MDP-induzierte Transkription und Translation pro- (TNF- $\alpha$ ), aber auch antiinflamma-

torischer (IL-10) Zytokine durch die Anwesenheit eines mutierten CARD15 Proteins signifikant beeinträchtigt ist. Um dies endgültig zu beweisen, bedarf es Studien mit größerer Patientenzahl.

#### *Genotyp – Phänotyp*

Die untersuchten homozygoten Patienten zeigten einen insgesamt schwereren Verlauf (früherer Beginn, Komplikationen, Operationen) und einen Befall mehrerer Darmabschnitte unter Beteiligung des Ileums, während Patienten mit Wildtyp eher einen isolierten Befall des Kolons aufwiesen. Aufgrund der geringen Patientenzahl müssen diese Zusammenhänge sehr vorsichtig bewertet werden, bestätigen jedoch die in zahlreichen Studien beschriebene phänotypische Besonderheit der Patienten mit Mutationen in CARD15 (1, 3, 34, 49, 72). Lediglich die Tatsache, dass bei Patienten mit Mutation gehäuft mehr als ein Darmabschnitt betroffen ist, wurde bisher nicht beschrieben. Im Zusammenhang mit den früher durchgeführten klinischen Studien kann angenommen werden, dass der genetische Hintergrund den Phänotyp beeinflusst. Die Mutation scheint einen schwereren Verlauf zu begünstigen. Ob es sich um einen spezifischen Phänotyp mit anderen Behandlungsoptionen handelt, kann derzeit jedoch noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden.

Die Tatsache, dass nicht alle Patienten mit Morbus Crohn eine Mutation haben und umgekehrt auch gesunde Menschen Träger einer Mutation sein können ohne jemals an einem Morbus Crohn zu erkranken (51), lässt darauf schließen, dass CARD15-Mutationen weder notwendig noch ausreichend sind, um einen Morbus Crohn zu erzeugen. Dies lässt den Rückschluss zu, dass eine Reihe weiterer genetischer Faktoren sowie Umweltfaktoren für eine Krankheitsmanifestation nötig sind.

### 5.2.5 Beurteilung der Ergebnisse in Bezug auf mögliche pathogenetische Zusammenhänge

Welche Rolle die erbrachten Ergebnisse im Pathomechanismus des CARD15-Mutation-assoziierten Morbus Crohn spielen, ist weiterhin nicht eindeutig. Der Mechanismus der Entstehung des Morbus Crohn bei Patienten mit CARD15-Mutationen kann mit verschiedenen, teilweise gegensätzlichen Hypothesen erklärt werden.

#### *„loss-of-function“-Hypothese*

CARD15-Mutationen befinden sich vorrangig in der LRR Domäne, die die Erkennungsregion für bakterielle Bestandteile darstellen soll (43). Die meisten dieser Mutationen scheinen allgemein eher zu einer Herabsetzung nachfolgender Effekte zu führen (18). Eine bedeutende Effekterniedrigung zeigten *in vitro* Studien: Ein durch die 3020insC Mutation verursachter Verlust, MDP zu erkennen, führte zu einer erniedrigten NF- $\kappa$ B-Aktivierung (8). Zusammen mit der hier gezeigten reduzierten MDP-induzierten TNF- $\alpha$  und IL-10 Transkription und Produktion in Monozyten 3020insC homozygoter Patienten weist dies darauf hin, dass Morbus Crohn-assoziierte Mutationen phänotypisch in einem Funktionsverlust (*„loss-of-function“*) resultieren. Diese verminderte Aktivierung von inflammatorischen Prozessen steht jedoch im Widerspruch zur *in vivo* Situation des Morbus Crohn, die durch eine Überaktivierung von NF- $\kappa$ B und TNF- $\alpha$  im Darmepithel und in immunkompetenten Zellen charakterisiert ist (71, 72, 77, 91). Ein möglicher Erklärungsversuche hierfür wäre das mögliche Vorliegen eines Defekts in der schnellen Antwort des angeborenen Immunsystems auf bakterielle Produkte wie MDP im Sinne einer Immundefizienz (63, 92), der in nachfolgenden oder parallelen Effekten zur Krankheitsmanifestation mit inflammatorischer Überaktivierung führt. Ein Signalierungsfehler der angeborenen Immunität gegenüber MDP scheint also einen essenziellen Defekt in der Pathogenese der CARD15-assoziierten Patienten mit Morbus Crohn darzustellen. Das Konzept der Immundefizienz (24) wird sowohl durch verschie-

dene klinische und therapeutische Erfahrungen als auch durch Modelle an Mäusen unterstützt. Eine Vielzahl seltener Immundefekte (Chronische Granulomatose, Glykogen Speicherkrankheit Ib, Leukozytenadhäsionsmangel) sind beim Menschen durch Defekte der neutrophilen oder monozytären Funktion charakterisiert und manifestieren sich als crohnähnlicher Phänotyp (45). Unter normalen Bedingungen führt eine schnelle neutrophile Migration nach einer Invasion von Fremdobjekten zu einer schnellen Digestion und Eradikation derselben. Ein Fehlschlagen dieses Prozesses führt wohl zur Phagozytose von Fremdartigen durch Makrophagen und schließlich zur chronischen Entzündung mit Bildung von Granulomen (56). Dies würde auch gut die Tatsache erklären, dass Granulome typischerweise nur mit Morbus Crohn und nicht mit Colitis ulcerosa in Zusammenhang gebracht werden. NF- $\kappa$ B defiziente Mäuse (p50<sup>-/-</sup>-p65<sup>+/-</sup>) haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine *Helicobacter hepaticus*-induzierte Kolitis auszubilden, was eine Rolle von NF- $\kappa$ B in der Vermeidung von intestinaler Entzündung erklären könnte (21).

#### *Weitere Hypothesen*

Patienten mit Morbus Crohn mit mutiertem CARD15 zeigten eine herabgesetzte Expression der  $\alpha$ -Defensine HD-5 und HD-6 in Paneth Zellen (97), und eine im Gegensatz zum Wildtyp fehlende antibakterielle Reaktion auf MDP in Intestinalepithelzellen (4). Mutationen in CARD15 scheinen also einen Verlust der antibiotischen Verteidigung im Intestinalepithel zu verursachen. Ob das Konzept der fehlenden antimikrobiellen Verteidigung bei defektem CARD15 auch auf Monozyten übertragen werden kann, ist unklar. Dies würde bedeuten, dass das CARD15-Protein in Monozyten eine alleinige Funktion in der Erkennung bakterieller Bestandteile übernehme. Dies erscheint unwahrscheinlich, da in Monozyten z.B. hochgradig TLRs exprimiert werden, die bei der Erkennung von bakteriellen Bestandteilen ein stärkeres NF- $\kappa$ B-Aktivierungspotential aufweisen als das CARD15-Protein (54).



Zusammengenommen unterstreichen diese Daten die Vorstellung der defekten angeborenen NF- $\kappa$ B Aktivierung in Antwort auf bakterielle Exposition, die durch einen Funktionsverlust von CARD15 bedingt ist. Letztendlich resultiert dies dann in einer verstärkten intestinalen Entzündung. Folglich kann spekuliert werden, dass Defekte der initialen, angeborenen Immunantwort mit folgender fehlerhaften Ausbildung der adaptiven Immunantwort zu einer gesteigerten Anfälligkeit einer Darmentzündung führen.

Auf der anderen Seite stehen die hier nachgewiesenen verminderten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA in Monozyten CARD15-mutierter Patienten mit Morbus Crohn die Daten einer aktuellen Studie an Mäusen gegenüber: Monozyten mit CARD15-Varianten zeigten nach Stimulation mit MDP eine vermehrte Aktivierung von NF- $\kappa$ B und dem proinflammatorischen IL-1 $\beta$  („*gain-of-function*“) (54). Diese Erkenntnisse stehen auch im Gegensatz zu anderen Studien an humanen Monozyten, die eine reduzierte NF- $\kappa$ B (63) und IL-1 $\beta$  Aktivierung nach MDP-Stimulation zeigten (50), ist jedoch mit der hohen NF- $\kappa$ B Aktivität und inflammatorischen Situation *in vivo* vereinbar (72, 91). Die Gründe für die Diskrepanz zwischen den Effekten von CARD15-Mutationen in der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und IL-1 $\beta$  Expression zwischen Monozyten von Mäusen und Menschen sind noch nicht ausreichend verstanden. Sowohl genetische und immunologische Unterschiede zwischen Maus und Mensch als auch technische oder methodische Gründe könnten zur Erklärung herangezogen werden und müssen anhand von humanen *ex vivo* Studien und Mausmodellen präzisiert werden.

Durch die dargestellten Daten konnte auf Grund der aus der Literatur bekannten Rezeptorfunktion von CARD15 für pathogene Bestandteile und dessen Funktionsverlust bei mit Morbus Crohn assoziierten Mutationen ein Zusammenhang zwischen angeborenem Immunsystem und chronischer Darmentzündung hergestellt werden. Außerdem konnte die pathogenetische Wertigkeit bakterieller Antigene im Darm bewiesen werden.

Bis zum vollständigen Verständnis des Mechanismus der CARD15-abhängigen Pathogenese von Morbus Crohn wird eine Identifizierung einer Vielzahl funktioneller Antworten auf den CARD15 Signalweg, insbesondere im Vergleich zu anderen angeborenen Signalwegen wie beispielsweise über membranständige TLRs notwendig sein.

### 5.3 **Schlussfolgerung und Ausblick**

Die Assoziation von CARD15-Mutation und Morbus Crohn eröffnet eine neue Ära in der Geschichte chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Bisher gingen die Modellvorstellungen zur Ätiopathogenese des Morbus Crohn von einem Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber luminalen – vor allem bakteriellen – Antigenen aus, der unter anderem genetisch bedingt ist und zu einer überschießenden, vorwiegend T-Zell bedingten inflammatorischen Antwort des adaptiven Immunsystems führt (80). Eine Reihe neuer Erkenntnisse aus klinischen Beobachtungen und Ergebnisse genetischer, immunologischer und tierexperimenteller Studien sowie die Erfahrungen mit neuen Therapieansätzen weisen jedoch darauf hin, dass der komplexen Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen primär eine Störung der angeborenen Immunität zu Grunde liegt. Die Rolle von CARD15 als Erkennungsrezeptor bakterieller Bestandteile und dessen Funktionsverlust bei mit Morbus Crohn assoziierten genetischen Varianten ergibt einen Zusammenhang zwischen angeborener Immunität und chronisch entzündlicher Darmerkrankung und beweist die pathogene Wichtigkeit von Darmbakterien. Der hier beschriebene Einfluss der Mutation auf die MDP-abhängige Expression von TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA stellt eine wichtige Ergänzung zu den neueren Erkenntnissen der Assoziation von Funktionsverlustmutationen des CARD15-Gens und Morbus Crohn dar. Die erbrachten Erkenntnisse zeigen, dass der Funktionsverlust von CARD15 auf zellulärer und phänotypischer Ebene eine Rolle spielt, indem er die mRNA-Ebene mit nachfolgender Proteinsekretion (88) beeinflusst, und das klinische Bild der Patienten verändert. Durch diese Daten konnte die pathogenetische Relevanz der CARD15-Mutation (3020insC) bestätigt und die Rolle von Darmbakterien bzw. deren Bestandteile im *downstream* der Entstehung des Morbus Crohn nachgewiesen werden.

Auch wenn diese Erkenntnisse entscheidend für das Verständnis der Ätiopathogenese des Morbus Crohn sind, spielen sie bislang in der klinischen Praxis nur eine geringe

Rolle. Weitere Studien zur Klärung eines Zusammenhanges zwischen Genotyp und Phänotyp und der Rolle von genetischen Tests, die ein bestimmtes Krankheitsverhalten voraussagen könnten, sind nötig. Die Untersuchung weiterer Funktionen von CARD15 sowie weiterer Rezeptoren für pathogene Bestandteile beim Morbus Crohn scheint für das Verständnis der Pathogenese von großer Bedeutung zu sein. Ein besser verstandener pathogener Mechanismus könnte zur Entwicklung neuer prophylaktischer und therapeutischer Therapien und einem individualisierten Einsatz derselben führen. Im Falle des Erreichens dieser prophylaktischen und therapeutischen Ziele werden genetische Tests als neue diagnostische Methode zur Identifizierung von Hoch-Risiko-Patienten und zur Vorhersage der Reaktion auf spezifische Therapien in der klinischen Praxis eine wichtige Rolle spielen.

## 6 Zusammenfassung

Es gibt zunehmend Hinweise auf genetische Komponenten in der Entstehung des Morbus Crohn. Die 3020insC-Mutation als die häufigste Mutation des mit Morbus Crohn assoziierten CARD15-Gens spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Ziel der Studie war es, den Einfluss der 3020insC-Mutation des CARD15-Gens auf die intrazelluläre TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expression in Monozyten von Morbus Crohn Patienten nach Stimulation mit dem bakteriellen Bestandteil MDP zu untersuchen.

Bei Monozyten der untersuchten Probanden und Patienten mit Morbus Crohn mit CARD15-Wildtyp konnte ein deutlicher Anstieg der TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expression nach 1,5 Stunden und 6 Stunden MDP-Stimulation nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnten bei für die 3020insC-Mutation homozygoten Patienten mit Morbus Crohn nach 1,5 Stunden und 6 Stunden MDP-Stimulation keine erhöhten TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expressionen beobachtet werden. Die nach MDP-Stimulation nachgewiesenen geringeren TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA-Expressionen in Monozyten von 3020insC-homozygoten Patienten gegenüber denen von Wildtyp-Patienten und gesunden Kontroll-Probanden waren für TNF- $\alpha$  nach 1,5 Stunden und für IL-10 nach 6 Stunden Stimulation jeweils signifikant.

Ein MDP-induziertes Expressionsmuster scheint also vom CARD15-Genotyp der Patienten mit Morbus Crohn abzuhängen. Durch die 3020insC-Mutation scheinen die Monozyten die Fähigkeit zur Erkennung von MDP mittels CARD15-Protein zu verlieren. Dies lässt eine Störung der angeborenen Immunität als pathogenen Mechanismus von Patienten mit Morbus Crohn mit CARD15-Mutation vermuten.

## 7 Literaturverzeichnis

1. **Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H.** 2002. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **123**:679-688.
2. **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.** 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**:854-866.
3. **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.** 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**:854-866.
4. **Begue B, Dumant C, Bambou JC, Beaulieu JF, Chamaillard M, Hugot JP, Goulet O, Schmitz J, Philipott DJ, Cerf-Bensussan N, Ruemmele FM.** 2006. Microbial induction of CARD15 expression in intestinal epithelial cells via toll-like receptor 5 triggers an antibacterial response loop. *J Cell Physiol* **209**:241-52.
5. **Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P et al.** 2003. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. *Gut* **52**:840-846.
6. **Beutler B.** 2004. Innate Immunity: an overview. *Mol Immunol* **40**:845-859.
7. **Bonen DK, Cho JH.** 2003. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **124**:521-536.
8. **Bonen DK, Ogura Y, Nicolae AD, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Roster SS, Duerr RG, Brant SR, Cho JH, Nunez G.** 2003. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signalling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* **124**.
9. **Booth IW, Harries JT.** 1984. Inflammatory bowel disease in childhood. *Gut* **25**:188-202.
10. **Cohen RD.** 2002. The quality of life in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol. Ther* **16**:1603-9.
11. **Conti P, Kempuraj D, Kandere K, Di Gioacchino M, Barbacane RC, Castellani ML, Felaco M, Boucher W, Letourneau R, Theoharides TC.** 2003. IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always. *Immunol Lett* **86**:123-9.
12. **Cotter MJ, Norman K, Hellewell PG, Ridger VC.** 2001. A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation. *Am J Pathol* **159**:473-81.
13. **Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD.** 2000. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. *Mt Sinai J Med* **67**:263-268.
14. **Cuthberg 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.** 2002. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:867-874.
15. **D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F.** 1998. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* **114**:262.
16. **Duchman R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH.** 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is

- broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* **102**:448-455.
17. **Duchman R, Zeitz M.** 1999. Crohn's Disease. In: Ogra P, Strober W (eds). *Handbook of mucosal Immunology*. Academic press, San Diego:1055.
  18. **Economou M, Trikalinos T, Loizou KT, Tsianos EV, Ionanidis JP.** 2004. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* **99**:2393-2404.
  19. **Elson CO.** 1999. Experimental models of intestinal inflammation: new insights into mechanism of mucosal haemostasis. *Academic Press*:1007-1024.
  20. **Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH.** 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **109**:1344-1367.
  21. **Erdman S, Fox JG, Dangler CA, Feldman D, Horwitz BH.** 2001. Typhlocolitis in NF-kappa B-deficient mice. *J. Immunol.* **166**:1443-1447.
  22. **Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA.** 1980. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterology* **9**:271-277.
  23. **Fillola G, Müller C, Bousquet R, Fontanilles AM, Laharrague P, Corberand JX.** 1995. Isolation of bone marrow plasma cells by negative selection with immunomagnetic beads. *J Immunol Meth* **190**:127-131.
  24. **Folwaczny C, Glas J, Torok HP.** 2003. Crohn's disease: An immunodeficiency. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **15**:621-626.
  25. **Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP.** 1998. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* **9**:67-78.
  26. **Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A.** 2005. Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* **49**:601-608.
  27. **Gaschè C, Schölmrich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR.** 2000. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* **6**:8-15.
  28. **Gaya DR, Black RA, MacKenzie JF.** 2004. Crohn's Disease and MAP. *Lancet* **364**:2179.
  29. **Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ.** 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**:8869-8872.
  30. **Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ.** 2002. Intracellular vs. extracellular recognition of pathogens-common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* **10**:193-199.
  31. **Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM.** 2001. Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* **33**:625-627.
  32. **Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL.** 2002. Induction of NOD2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem* **277**:41701-41705.
  33. **Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G.** 2003. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: A long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology* **124**:1767-1773.
  34. **Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M,**

- Schreiber S.** 2002. Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn's disease: A cohort study. *Lancet* **359**:1661-1665.
35. **Hein J, Schelenberg U, Bein G, Hackstein H.** 2001. Quantification of murine IFN-gamma mRNA and protein expression: impact of real-time kinetic RT-PCR using SYBR green I dye. *Scand J Immunol* **54**:285-91.
36. **Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCornick BA, Podolsky DK.** 2003. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **124**:993-1000.
37. **Hoffmann JC, Zeitz M.** 2002. Standardtherapie bei Morbus Crohn. *Internist* **43**:1376-1385.
38. **Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF.** 2002. Das mukosale Immunsystem: Wie klar ist die Pathophysiologie? *Internist* **43**:1343-1353.
39. **Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard JP.** 2003. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **362**:2012-2015.
40. **Hugot JP, Chammalard M, Zouali H, Lesage s, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G.** 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:599-603.
41. **Iddan G et al.** 2000. Wireless Capsule Endoscopy. *Nature* **450**:417.
42. **Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J et al.** 1999. Nod1, an Apaf-1 like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* **274**:14560-14567.
43. **Inohara N, Ogura Y, Chen FF.** 2001. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharids. *J Biol Chem* **276**:2551-2554.
44. **Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G.** 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. *J Biol Chem* **278**:5509-5512.
45. **Korzenik JR, Dieckgraefe BK.** 2000. Is Crohn's disease an immunodeficiency? A hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **45**:1121-1129.
46. **Kuster W, Pascoe L, Purrmann J, Funk S, Majewski F.** 1989. The genetics of Crohn's disease: complex segregation analysis of a family study with 265 patients with Crohn's disease and 5 387 relatives. *Am J Med Genet* **102**:1940-1948.
47. **Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S.** 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* **125**:47-57.
48. **Lashner BA.** 2000. Clinical features, laboratory findings, and course of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **5**:305-314.
49. **Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group.** 2002. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* **70**:845-857.
50. **Li J, Moran T, Swanson E, Julian C, Harris J, Bonen DK, Hedl M, Nicolae DL, Abraham C, Cho JH.** 2004. Regulation of IL-8 and IL-1 $\beta$  expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum Mol Genet* **13**:1715-25.



51. **Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Kuipers EJ, Wilson JH, de Rooij FW.** 2003. Healthy homozygous carriers of the 3020insC frameshift mutation. *Am J Gastroenterol* **98**:613-617.
52. **Linderson Y, Bresso F, Buentke E, Petterson S, D'Amato M.** 2005. Functional interaction of CARD15/NOD2 and Crohn's disease-associated TNF-alpha polymorphisms. *Int J Colorectal Dis* **20**:305-11.
53. **Loftus EV jr.** 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* **126**:1504-1517.
54. **Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Limura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M.** 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* **308**:633.
55. **Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A.** 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometrie* **11**:231-238.
56. **Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Watanabe K, Tateishi H, Nishiyama T, Saiki T, Ikeda H, Tsuruta O and Tanikawa K.** 1994. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin. Exp. Immunol.* **96**:432-436.
57. **Mittal NK, Kirschner B.** 1994. Chronic inflammatory bowel disease. *Indian J Pediatr* **61**:655-663.
58. **Muller CA, Autenrieth I, Peschel A.** 2005. Innate defenses of the intestinal barrier. *Cell Mol Life Sci* **62**:1297-1307.
59. **Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF.** 2004. Culture of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* **364**:1039-1044.
60. **Netea MG, Kullberg B, de Long DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, Drenth JP, Van der Meer JW.** 2004. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* **34**:2052-2059.
61. **Neurath MF, Schuermann G.** 2000. Zur Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. *Chirurg* **71**:30-40.
62. **Ogura Y, Bonen DKK, 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.,** 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**:603-606.
63. **Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamoka S, Nunez G.** 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* **276**:4812-4818.
64. **Orholm M, Iselius L, Munkholm P, Langholz E, Binder V.** 1993. Investigations of inheritance of chronic inflammatory bowel diseases by complex segregation analysis. *BMJ* **306**:20-24.
65. **Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V.** 1991. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Eng J Med* **324**:84-88.
66. **Overbergh L, Giulietti A, Valckx D, Decallonne R, Bouillon R, Mathieu C.** 2003. The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biol Tech.* **14**:33-43.
67. **Pauleau AL, Murray PJ.** 2003. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol. Cell. Biol* **23**.
68. **Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P.** 1996. Familial aggregation in Crohn's disease: Increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. 1996 **111**:597-603.

69. **Podolsky DK.** 2002. Inflammatory Bowel Disease. *N Eng J Med* **347**:417-429.
70. **Qiagen.** 2001. RNeasy mini Handbook.
71. **Radema SA, van Dullemen H, Mevissen M, Jansen J, van Deventer SJH.** 1996. Anti-TNF $\alpha$  therapy decreases production of chemokines in patients with Crohn's disease. Cytokine production, immune activation and neutrophil migration in inflammatory bowel disease (disease), Amsterdam: Univ. of Amsterdam.
72. **Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C.** 2002. The C-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* **122**:2091-2092.
73. **Rehli M.** 2002. Of mice and men: species variation of toll-like receptor expression. *Trends Immunol* **23**.
74. **Romagnani S.** 2000. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol* **85**:9-18.
75. **Ruan HJ, Brown CY, Morris DR.** 1997. Analysis of mRNA Formation and Function. *Academic*:305-321.
76. **Sartor RB.** 1994. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* **106**:533-539.
77. **Sartor RB.** 2004. Therapeutic manipulations of the enteric microflora in inflammatory bowel disease: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology* **126**:1620-1633.
78. **Schlessinger M, Fordtran's JS.** 1998. *Gastrointestinal and Liver Disease.*
79. **Seibold F.** 2005. Food-induced immune responses of owl disease? *Digestion* **71**:251-260.
80. **Shanhan F.** 2002. Crohn's Disease. *Lancet* **359**:62-69.
81. **Siegmund B, Eigler A, Moeller J, Greten TF, Hartmann G, Endres S.** 1997. Suppression of tumor necrosis factor- $\alpha$  production by interleukin-10 is enhanced by cAMP-elevating agents. *Eur J Pharmacology.*
82. **Sutton CL, Kim J, Yamane A, et al.** 2000. Identification of a novel bacterial sequence associated with Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**.
83. **Swatoch, P.** 2005. Etablierung und Evaluierung einer Real-time-RT-PCR zur quantitativen Analyse der genexpression von 7 humanen Zytokinen, Tübingen.
84. **Swidinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H.** 2002. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **122**:44-54.
85. **Targan SR, Deem R, Liu M, Wang S, Nel A.** 1995. Definition of a lamina propria T cell responseive state. Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. *J Immunol* **154**:664.
86. **Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ.** 1996. Genetic versus environment in inflammatory bowel disease: Results of a British twin study. *BMJ* **312**:95-96.
87. **Török HP, Glas J, Lohse P, Folwaczny C.** 2003. Alterations of the CARD15/NOD2 Gene and the Impact on Management and Treatment of Crohn's Disease. *Dig Dis* **21**:339-345.
88. **Török HP, Glas J, Schaaf A, Wagner S, Ochsenkühn T, Lohse P, Mussack T, Folwaczny C.** 2004. TNF $\alpha$  and IL-10 Release According to the CARD15/NOD2 Genotype in Peripheral Blood Monocytes from Patients with Crohn's Disease. *Supp to Gastroenterology* **126**:A104.
89. **Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B.** 1988. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins: A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **29**:990-996.

90. **Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, Sugawara S, Takada H.** 2005. Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like-receptor agonists synergistically induced production of Interleukin-8 in a NOD2- and NOD1- dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cellular Microbiology* **7**:53-61.
91. **Van Deventer SJH.** 1997. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* **40**:443-448.
92. **van Heel DA, Gosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ.** 2005. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* **365**:1794-6.
93. **Vermeire S, Rutgeerts P.** 2005. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. *Genes Immun.*
94. **Wajant, HW, Pfizenmaier K, Scheurich P.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**:45-65.
95. **Wang JE, Jorgensen PF, Ellingsen EA, Almiof M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R.** 2001. Peptidoglycan primes for LPS-induced release of proinflammatory cytokines in whole human blood. *Shock* **16**:178-182.
96. **Weghofer M, Karlic H, Haslberger A.** 2001. Quantitative analysis of immune-mediated stimulation of tumor necrosis factor-alpha in macrophages measured at the level of mRNA and protein synthesis. *Ann Hematol* **80**:733-6.
97. **Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäfferler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM et al.** 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* **53**:1658-1664.
98. **Wolfert MA, Murray TF, Boons GJ, Moore JN.** 2002. The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *Biol Chem* **277**:39174-39186.
99. **Yang H, Taylor KT, Rotter JI.** 2001. Inflammatory Bowel Disease. *Mol Gen Met* **74**:1-21.
100. **Yang SK, Loftus EV jr, Sandborn WJ.** 2001. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflamm Bowel Dis* **7**:260-270.
101. **Zahler S, Kowalski C, Brosig A, Kupatt C, Becker BF, Gerlach E.** 1997. 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* **200**:173-9.

## 8 Anhang

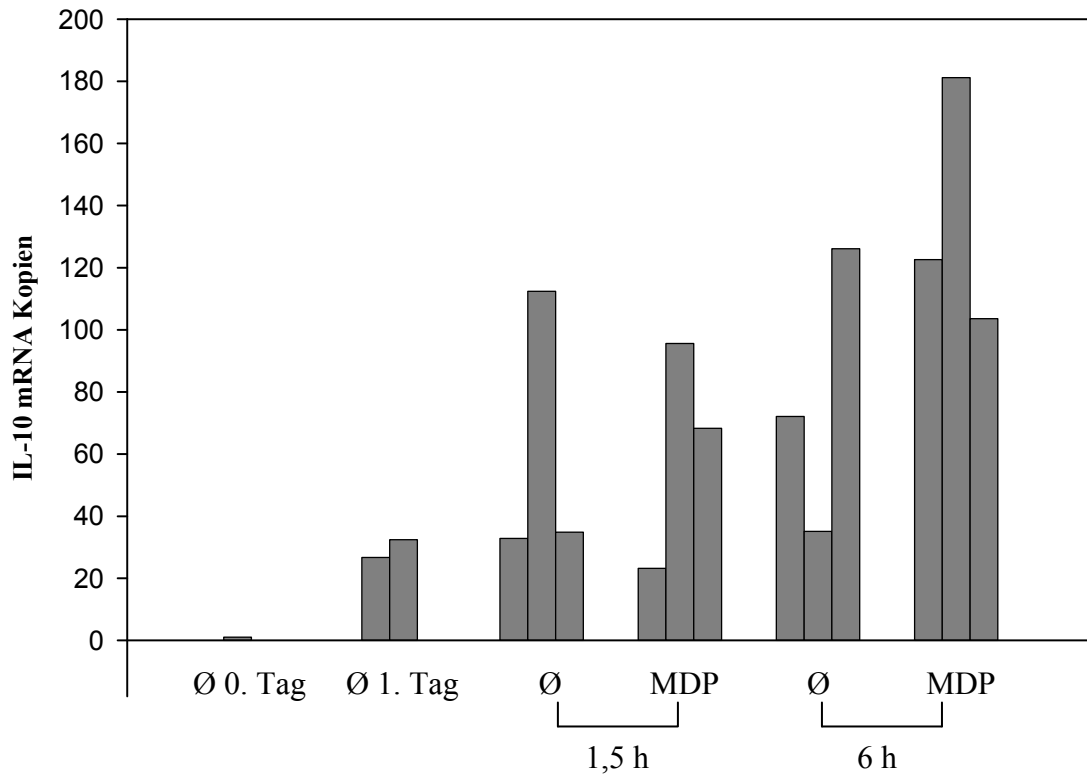
### CDAI (nach Best)

Kriterium	Multiplikator	Ergebnis
Anzahl der ungeformten Stühle der letzten Woche: _____	x 2	
<b>Grad der Bauchschmerzen</b> Keine Schmerzen an ___ Tagen x 0 = _____ Leichte Schmerzen an ___ Tagen x 1 = _____ Mäßige Schmerzen an ___ Tagen x 2 = _____ Starke Schmerzen an ___ Tagen x 3 = _____ <b>Gesamtsumme:</b> _____	x 5	
<b>Grad des Allgemeinbefindens</b> über eine Woche Gutes Allgemeinbefinden an ___ Tagen x 0 = _____ Mäßiges Befinden an ___ Tagen x 1 = _____ Schlechtes Befinden an ___ Tagen x 2 = _____ Sehr schlechtes Befinden an ___ Tagen x 3 = _____ Unerträgliches Befinden an ___ Tagen x 4 = _____ <b>Gesamtsumme:</b> _____	x 7	
<b>Assoziierte Symptome</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Iritis/Uveitis</li> <li>• Stomatitis aphthosa</li> <li>• Pyoderma gangraenosum</li> <li>• Erythema nodosum</li> <li>• Arthralgien/Arthritis</li> <li>• Analfissur/Analfisteln</li> <li>• Andere Fisteln</li> <li>• T &gt; 37°C</li> </ul> <b>Anzahl der zutreffenden Punkte</b> _____	x 20	
<b>Symptomatische Durchfallbehandlung</b> (z.B. Loperamid) Ja = 30 Nein = 0		
<b>Resistenz im Abdomen</b> Nein = 0 Fraglich = 2 Sicher = 5	x 10	
<b>Hämatokrit</b> Männer: 47 Frauen: 42 Minus Hämatokrit = _____	x 6	
<b>Gewicht</b> 1 – (Körpergewicht in kg / Standardgewicht in kg) = _____	x 100	
<b>GESAMTSUMME AKTIVITÄTSINDEX</b>		

Eine Punktzahl über 150 spricht für einen Schub, eine Punktzahl über 450 für einen sehr schweren Schub. Ein Rückgang der Punktzahl um 70 Punkte spricht für ein klinisches Ansprechen auf die Therapie. Ein Rückgang der Punktzahl auf unter 150 Punkte spricht für das Erreichen einer klinischen Remission. Entscheidend für die Abschätzung der Aktivität ist die ärztliche Einschätzung und nicht der CDAI.

Abbildung 8.1:

Crohn's Disease Activity Index (CDAI)



**Abbildung 8.2:**

unnormierte Rohwerte von IL-10 mRNA eines homozygoten Patienten (Patient 9). Stimulation und Auswertung zu jedem Zeitpunkt 2 bis 3fach. Bestimmung zum Abnahmezeitpunkt, nach einem Tag Kultur und jeweils nach 1,5 bzw. 6 Stunden Stimulation mit 100 ng/dl MDP und zu den gleichen Zeitpunkten ohne Stimulation. Ø = Medium ohne Stimulanz, MDP = Medium mit MDP

**Tabelle 8.1**

P-Werte/signifikante Unterschiede bei Vergleich der TNF- $\alpha$  mRNA-Expression mit und ohne MDP Stimulation je Gruppe (Wilcoxon-Test) und bei Vergleich der Gruppen miteinander (Mann-Whitney-U-Test)

WtG: Wildtyp, gesund

WtMC: Wildtyp, Morbus Crohn

Hom: Homozygot, Morbus Crohn

Ø MDP: ohne Stimulation

MDP: mit MDP-Stimulation

### TNF- $\alpha$ - Signifikanzen

Vergleich Ø → mit MDP	P	signifikant
WtG 1,5 h Ø MDP → WtG 1,5 h MDP	0,250	—
WtG 6 h Ø MDP → WtG 6 h MDP	0,435	—
Wt MC 1,5 h Ø MDP → Wt MC 1,5 h MDP	0,2	—
Wt MC 6 h Ø MDP → Wt MC 6 h MDP	0,091	—
Hom 1,5 h Ø MDP → Hom 1,5 h MDP	0,81	—
Hom 6 h Ø MDP → Hom 6 h MDP	0,125	—
Vergleich Gruppe 1 ↔ Gruppe 2	P	signifikant
WtG 1,5 h Ø MDP ↔ Hom 1,5 h Ø MDP	0,745	—
WtG 1,5 h MDP ↔ Hom 1,5 h MDP	<b>0,036</b>	<b>ja</b>
WtG 6 h Ø MDP ↔ Hom 6 h Ø MDP	1	—
WtG 6 h MDP ↔ Hom 6 h MDP	0,071	—
Wt MC 1,5 h Ø MDP ↔ Hom 1,5 h Ø MDP	0,120	—
Wt MC 1,5 h MDP ↔ Hom 1,5 h MDP	<b>0,008</b>	<b>ja</b>
Wt MC 6 h Ø MDP ↔ Hom 6 h Ø MDP	0,841	—
Wt MC 6 h MDP ↔ Hom 6 h MDP	0,0548	—
WtG 1,5 h Ø MDP ↔ Wt MC 1,5 h Ø MDP	0,314	—
WtG 1,5 h MDP ↔ Wt MC 1,5 h MDP	0,684	—
WtG 6 h Ø MDP ↔ Wt MC 6 h Ø MDP	0,784	—
WtG 6 h MDP ↔ Wt MC 6 h MDP	0,459	—

**Tabelle 8.2:**

P-Werte/signifikante Unterschiede bei Vergleich der IL-10 mRNA-Expression mit und ohne MDP Stimulation je Gruppe (Wilcoxon-Test) und bei Vergleich der Gruppen miteinander (Mann-Whitney-U-Test)

WtG: Wildtyp, gesund

WtMC: Wildtyp, Morbus Crohn

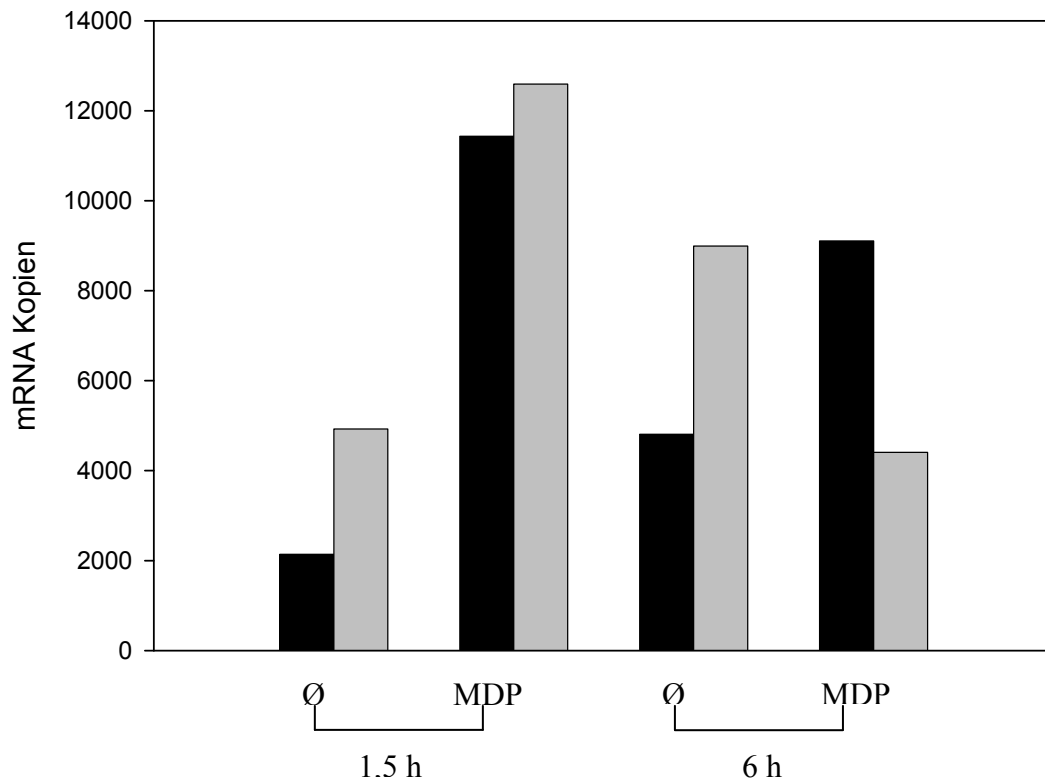
Hom: Homozygot, Morbus Crohn

Ø MDP: ohne Stimulation

MDP: mit MDP-Stimulation

### IL-10-Signifikanzen

Vergleich Ø → mit MDP	P	signifikant
WtG 1,5 h Ø MDP → WtG 1,5 h MDP	0,250	—
WtG 6 h Ø MDP → WtG 6 h MDP	0,250	—
Wt MC 1,5 h Ø MDP → Wt MC 1,5 h MDP	0,188	—
Wt MC 6 h Ø MDP → Wt MC 6 h MDP	0,625	—
Hom 1,5 h Ø MDP → Hom 1,5 h MDP	0,425	—
Hom 6 h Ø MDP → Hom 6 h MDP	0,355	—
Vergleich Gruppe 1 ↔ Gruppe 2	P	signifikant
WtG 1,5 h Ø MDP ↔ Hom 1,5 h Ø MDP	0,155	—
WtG 1,5 h MDP ↔ Hom 1,5 h MDP	0,393	—
WtG 6 h Ø MDP ↔ Hom 6 h Ø MDP	0,393	—
WtG 6 h MDP ↔ Hom 6 h MDP	<b>0,036</b>	<b>ja</b>
Wt MC 1,5 h Ø MDP ↔ Hom 1,5 h Ø MDP	0,421	—
Wt MC 1,5 h MDP ↔ Hom 1,5 h MDP	0,095	—
Wt MC 6 h Ø MDP ↔ Hom 6 h Ø MDP	0,056	—
Wt MC 6 h MDP ↔ Hom 6 h MDP	0,841	—
WtG 1,5 h Ø MDP ↔ Wt MC 1,5 h Ø MDP	0,143	—
WtG 1,5 h MDP ↔ Wt MC 1,5 h MDP	0,071	—
WtG 6 h Ø MDP ↔ Wt MC 6 h Ø MDP	0,571	—
WtG 6 h MDP ↔ Wt MC 6 h MDP	0,393	—



**Abbildung 8.3:**

GAPDH mRNA Rohwerte (Zweifachbestimmung) eines homozygoten Patienten; Ø: ohne Stimulation, MDP: Stimulation mit 100 ng/dl MDP



## Danksagung

Herrn PD Dr. Thomas Mussack und Herrn Prof. Dr. Christian Folwaczny möchte ich für die Überlassung des Themas und Herrn PD Dr. Thomas Mussack insbesondere für die hervorragende Unterstützung während der Arbeit herzlich danken.

Frau Dr. Helga Török, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte, möchte ich für ihre ausgezeichnete und freundliche Betreuung bei der Durchführung der gesamten Arbeit sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Patienten und Probanden für die Bereitschaft, an dieser Studie teilzunehmen.

Auch danke ich sehr herzlich allen Mitarbeitern, Doktoranden und dem ehemaligen Leiter, Dr. Peter Neth des Chirurgischen Forschungslabors, die durch anregenden und kompetenten Austausch dazu beigetragen haben, dass ich diese Studie mit viel Freude bearbeiten konnte.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und Ermutigung. Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mir mein Studium ermöglicht haben und mir dabei immer Rückhalt gaben.

# Lebenslauf

## PERSÖNLICHE DATEN

Name Stefanie Sonja Wagner

Geburtsdatum/-ort 15.01.1981/München

## SCHULE

1991-2000 Gymnasium Starnberg, allgemeine Hochschulreife

1998 3 Monate Schulbesuch in Genua (Italien)

## STUDIUM

2000-2007 Studium der Humanmedizin, LMU München

2003-2005

### Famulaturen

- chirurgische Ambulanz (Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Gynäkologie und Geburtshilfe (Canterbury Hospital, King's and St. Thomas's Medical School, University of London/England)
- Neonatologie (Università Degli Studi Di Sassari/Italien)
- Viszeralchirurgie (Klinikum Innenstadt, LMU München)

2006-2007

### Praktisches Jahr

- Chirurgie (University Of Kwazulu-Natal, Durban/Südafrika)
- Gynäkologie und Geburtshilfe (Klinikum Innenstadt, LMU München)
- Innere Medizin (Kantonsspital Luzern/Schweiz)

06/2007

ärztliche Prüfung, Note 2,0

## BERUF

seit 07/2007

Assistenzärztin an der I. Universitätsfrauenklinik der LMU München

## STIPENDIEN

2004/2006

Auslandsförderung durch den DFA/IFSMA (Italien und Südafrika)

## EHRENAMTLICHE TÄTIGKEITEN

2001-2004

„Teddy-Arzt“ (Kinderklinik, Klinikum Innenstadt, LMU München)

9/2005

„Sariry e. V.“, Hilfsprojekt zur Unterstützung bedürftiger Kinder (La Paz/Bolivien)

seit 2001

Benefizprojekte, Sinfonisches Orchester München-Andechs