

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Campus Großhadern
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Der Einfluß der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile auf die
Pathogenese und den Phänotyp des Morbus Crohn**

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

vorgelegt von

Tanja Staudinger

aus
München

Jahr
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Diepolder
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sibylle Koletzko
- Mitberichterstatter: Prof. Dr. Manfred Gross
Priv. Doz. Dr. Andreas Eigler
- Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Stephan Brand
- Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Morbus Crohn.....	1
1.1.1	Historischer Hintergrund.....	1
1.1.2	Therapie.....	2
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	4
1.1.4	Genetik.....	9
1.1.5	Immunologische Pathogenese-Aspekte: Störungen der Immunantwort und der Mukosabarriere.....	13
1.2	Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	17
1.2.1	Allgemeine Übersicht über TLRs.....	17
1.2.2	TLR4 und seine Polymorphismen.....	21
1.3	Ziel der Arbeit.....	23
2	Methodik.....	24
2.1	Untersuchungskollektive.....	24
2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	26
2.2.1	DNA-Isolierung.....	26
2.2.2	DNA-Amplifikation.....	27
2.2.3	PCR-Produktnachweis.....	29
2.3	DNA-Präzipitation mit Ethanol.....	32
2.4	Nachweis der Polymorphismen mittels Restriktionsendonukleasenverdau.....	32
2.4.1	Restriktionsendonukleasenverdau.....	32
2.4.2	Low Melting Point (LMP)-Elektrophorese.....	33
2.5	Analyse der NOD2-Mutationen.....	34
2.6	Statistische Auswertung.....	35
3	Resultate.....	36
3.1	Häufigkeit der TLR4-Polymorphismen in den Kollektiven.....	36
3.2	Analyse der Phänotyp-Verteilung im Kollektiv.....	38
3.3	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	42

4	Diskussion.....	53
4.1	Häufigkeit der TLR 4-Polymorphismen.....	53
4.2	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	63
4.2.1	Krankheitsverlauf.....	63
4.2.2	Ersterkrankungsalter.....	66
4.2.3	Befallsmuster.....	67
4.2.4	Extraintestinale Manifestationen.....	69
4.2.5	Gene und ihre Phänotypen und der potentielle TLR4-Phänotyp.....	70
4.3	Funktionelle Konsequenzen der TLR4-Polymorphismen.....	70
5	Zusammenfassung.....	72
6	Literaturverzeichnis.....	73
7	Abbildungsverzeichnis.....	84
8	Tabellenverzeichnis.....	85
9	Abkürzungsverzeichnis.....	87
10	Danksagung.....	90
11	Curriculum Vitae.....	91

1 Einleitung

1.1 Morbus Crohn

1.1.1 Historischer Hintergrund

Unter dem Begriff der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) werden üblicherweise die idiopathischen Erkrankungen Colitis ulcerosa (CU) und Morbus Crohn (MC) zusammengefasst. Eine weitere Subgruppe dieser Entität bilden die 10% der Patienten mit einer so genannten Colitis indeterminata (CI), bei denen die Erkrankung nicht eindeutig klassifiziert werden kann.⁴⁵ Diese Zuordnungsproblematik der zwei sich in mehreren Merkmalen ähnelnden Erkrankungen besteht erst seit der Akzeptanz des Morbus Crohn im Jahre 1932 als eigenständigem klinischen Krankheitsbild.⁴⁴ Die Kasuistiken zuvor - von Morgagni^{116, 154}, Combe und Saunders^{40, 116}, Dalziel^{48, 116} und schließlich Moschcowitz¹⁵⁶ und Wilensky²⁶⁰ - führten, im Gegensatz zur Publikation „Regional enteritis: A pathological and clinical entity“ von Burrill B. Crohn et al. (1932)⁴⁴, nicht zur Auffassung der Erkrankung als klinische Entität. In der Publikation von B. Crohn et al. wird anhand von 14 Patienten des Mount Sinai Hospitals (New York), die Morphologie und die Klinik der „Ileitis regionalis“ⁱ dargestellt. Im Detail werden u.a. die Leitsymptome Fieber, Durchfall, Gewichtsverlust sowie Unterbauchschmerzen beschrieben und außerdem die pathologischen Charakteristika dieser subakuten bzw. chronischen nekrotisierenden und vernarbenden Entzündung, wie Fistelbildung und Stenosierung, herausgearbeitet. Zusätzlich beschrieben Crohn et al. (1932)⁴⁴ das terminale Ileum als einzige Befallslokalisierung, was u.a. Dalziel (1913)^{48, 116}, Moschcowitz (1923)¹⁵⁶, Wilensky (1927)²⁶⁰ mit der Beschreibung von nicht-tuberkulösen Granulomen im gesamten Dünndarm, und zum anderen Wells (1952)²⁵⁷ sowie Lockhart-Mummery / Morson (1960)¹³⁴ durch Berichte über das Auftreten von Kolonbefällen, widerlegen. Neben der Exazerbation im gesamten Gastrointestinaltrakt, wie es mittlerweile erwiesen ist, können auch extraintestinale Manifestationen auftreten, wie Greenstein et al.⁸⁵ aufzeigen.

Diese Entwicklungshistorie ist in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

ⁱ Vor der Einführung des Begriffes Morbus Crohn wurde diese Erkrankung zunächst als „Ileitis terminalis“ bzw. um eine negative Assoziation mit einem Endstadium zu vermeiden, als „Ileitis regionalis“ bezeichnet.

Jahr	Erkenntnis	Beschreiber
1612	Bei der Autopsie eines Patienten mit persistierenden Bauchschmerzen und Diarrhoe stellte Gullielmus Fabricius Hildenus ein ulzeriertes kontrahiertes Caecum mit Ileuminvagination fest.	Wilhelm Fabry ^{66, 69, 116}
1761 / 69	Beschreibung der Autopsie eines 20-Jährigen mit Perforation eines entzündeten distalen Ileums und vergrößerten mesenterialen Lymphknoten	Morgagni ^{116, 154}
1813	Verdicktes, entzündlich verändertes Ileum bei der Autopsie eine Patienten mit lebenslangen kolikartigen Unterbauchschmerzen	Combe, Saunders ^{40, 116}
1828	Ähnliche Kasuistik	Abercrombie ^{1, 116}
1830	Beschreibung der Erkrankung bei Kindern mit Fisteln als Komplikation	Colles ^{39, 116}
1913	9 Fälle einer interstitiellen Jejunitis, Ileitis und Colitis	Dalziel ^{48, 116}
1923 / 27	4 Patienten mit granulomatöser Colitis	Moschcowitz, Wilensky ^{156, 260}
1932	Beschreibung der Ileitis terminalis anhand von 14 Fällen im Mount Sinai Hospital	Crohn, Ginzburg, Oppenheimer ⁴⁴
1952	Bei zahlreichen Colitis ulcerosa-Patienten liegt eher ein M. Crohn des Kolons vor.	Wells ²⁵⁷
1960	Beschreibung des primären Zäkumbefalls mit pathohistologischer Differenzierung zur Colitis ulcerosa	Lockhart-Mummery, Morson ^{116, 134}

Tabelle 1: Historische Aspekte des Morbus Crohn

1.1.2 Therapie

Seit der Erstbeschreibung vor über 70 Jahren sind wesentliche Fortschritte bezüglich der Therapie, insbesondere im pharmakologischen Bereich, erzielt worden, die die Krankheitssymptome lindern und die Lebensqualität der Betroffenen verbessern können. Jedoch Aussicht auf Heilung besteht immer noch nicht. Außerdem lässt sich trotz zahlreicher medikamentöser Therapieoptionen eine chirurgische Intervention bei den meisten Patienten derzeit nicht vermeiden. Einen Überblick über die Möglichkeiten der Pharmakotherapie des Morbus Crohn soll die nachfolgende Tabelle 2 geben. Für weitere Details wird auf die gebräuchlichen Algorithmen verwiesen.²²⁹

Kapitel 1 - Einleitung

Therapieoption	Wirkungsmechanismus	Anwendung
5-Aminosalizylate und Glukokortikoide ^{109, 189}		
Mesalazin, Balsalazin, Olsalazin, Sulfasalazin	Inhibition der Prostaglandin- und Leukotriensynthese, der NF- κ B-Aktivierung, der Chemotaxis von Makrophagen und Neutrophilen; Abfangen reaktiver Sauerstoffverbindungen	Behandlung des milden akuten Schubes und Remissionsinduktion; kein Stellenwert in der Remissionserhaltung; größere Bedeutung für Colitis ulcerosa (Reduktion des Kolonkarzinom-Risikos).
(Methyl-) Prednisolon, Prednison	Bindung an Glukokortikoidrezeptor, Induktion der Expression antiinflammatorischer Proteine (z.B. Lipocortin), Suppression proinflammatorischer Proteine (NO-Synthetase, Cyclooxygenase, Zytokine IL -1 und TNF- α), Hemmung des Makrophagen-MIF	Akuter Schub; Remissionsinduktion
Betamethason, Hydrocortison		Topische Therapie; Indikation s.o.
Budesonid		Lokaltherapie, insbes. bei Befall des terminalen Ileums und des rechtsseitigen Kolons; Indikation s.o.
Immunsuppressiva ^{77, 109, 129, 147, 163, 180, 185, 203}		
Azathioprin, 6-Mercaptopurin	Hemmung der Lymphozytenfunktion über die Hemmung der Purinsynthese und Apoptoseinduktion mukosaler T-Zellen	Remissionserhaltung, Steroid-einsparung bei chron. Aktivität Fistelverschluss in Diskussion
Methotrexat	Hemmung der Thymidin- und Purinsynthese über die Störung der THF-Bereitstellung als Antimetabolit	Bei Steroidrefraktärität / -abhängigkeit zur Remissionsinduktion und -erhaltung
Mycophenolat-mofetil	Blockade der Lymphozyten-Purinsynthese durch Hemmung der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase	Reservemittel mit noch unsicherer Studienlage
Cyclophosphamid	DNA-Alkylierung durch Cyclophosphamid-Metabolite	Reservemittel für schwerstkranke, therapieresistente Patienten
Ciclosporin	Hemmung der T-Lymphozytenfunktion durch Störung der Ca ²⁺ -abhängigen intrazellulären Signalinduktion	Reservemittel bei schwerer Colitis ulcerosa
Tacrolimus (FK-506)		Infliximabalternative bei problematischen Fisteln
Immunbiologika ^{19, 109, 180, 184, 199, 208}		
Infliximab	Apoptoseinduktion von Monozyten und T-Helferzellen durch murine neutralisierende monoklonale TNF- α -Antikörper	Gute Wirksamkeit bei schweren Verläufen zur Remissionsinduktion und -erhaltung und Fisteltherapie
Adalimumab	Rekombinanter, monoklonaler TNF-Antikörper	Wirksamkeit in vier Pilotstudien
CDP-870 (Certolizumab)	Vollständig humanisierte anti-TNF α F _{ab} -Fragmente mit Polyethylenglykolkolmolekül	Gewisse Wirksamkeit in Studien, v.a. bei CRP-Erhöhung
CDP-571 (Humicade)	Rekombinante humanisierte Anti-TNF- α -Antikörper	
Natalizumab	Hemmung der T-Lymphozyteneinwanderung und -aktivierung über rekombinante humanisierte α_4 -Integrin-Antikörper	Positive Effekte in Pilotstudien Phase III-Studien; weitere Studien erforderlich; Natalizumab wird derzeit wegen drei Fällen von progressiver multifokaler Leukoenzephalopathie pausiert
MLN-02		
Thalidomid	Hemmung der TNF- α -Produktion	Gewisser Effekt in Pilotstudien

Pro- und Antibiotika ^{109, 203, 209, 212}		
E. coli Nissle 1917, Lactobacilli, Bifidobakterien	Wiederherstellung einer bakteriellen Homöostase; Inhibition der Pathogenadhäsion / -invasion, Verbesserung der Mukosabarrierefunktion; Immunmodulation	Keine generelle Empfehlung, unklare Studienlage
Metronidazol, Gyrasehemmer	Reduktion der Gewebeinvasion, Eliminierung aggressiver Bakterienspezies, Reduktion der luminalen und mukosalen Bakterienkonzentration	Fisteln, Analfissuren, Abszesse, toxisches Megakolon, Infektionen, bakterielle Überbesiedlung, Remissionsinduktion
Weitere, neuere (experimentelle) Ansätze ^{110, 165, 180, 185, 232}		
Antiinflammatorische Zytokine, IL-Rezeptoren-Antikörper, Hemmstoffe der intrazellulären Kaskade, Interferon- α / - β -1 α , Interferon- γ -Antikörper, 6-Thioguanin, Leflunomid, Trichuris suis, Boswellia serrata, Cannabinoide		

Tabelle 2: Übersicht über die Pharmakotherapie des Morbus Crohn

Es steht daher in der heutigen Zeit ein breites Spektrum an Substanzen für die Pharmakotherapie zur Verfügung. Jedoch handelt es sich dabei durchweg lediglich um empirische Ansätze. Angesichts dieses Mangels an einer kausalen Therapie, gewinnt die Erforschung der Krankheitsursachen eine besondere Bedeutung. In Kenntnis der auslösenden Faktoren und Krankheitsprädispositionen könnten wesentliche Therapieverbesserungen erzielt und vielleicht sogar eine Krankheitsprophylaxe entwickelt werden.

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die exakte Pathogenese des Morbus Crohn, als eine der idiopathischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, ist derzeit noch nicht hinreichend geklärt. In der Literatur werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Von den meisten Autoren der gegenwärtigen Publikationen wird eine komplexe multifaktorielle Ätiopathogenese favorisiert, bei der verschiedene der diskutierten Mechanismen bei der Krankheitsentstehung zusammenwirken. ^{26, 162, 201, 222, 230} Eine sogenannte *Conditio sine qua non* ist bislang nicht identifiziert worden. Auf der Suche nach pathogenetisch bedeutsamen Faktoren können epidemiologische Untersuchungen Aufschluss geben.

In Deutschland liegt die Anzahl der Neuererkrankungen an Morbus Crohn zwischen 3,0 und 5,2 pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Der zeitliche Vergleich der verschiedenen deutschen Studien (Tabelle 3) zeigt einen raschen Inzidenzanstieg in den Nachkriegsjahren bis zur Stabilisierung in den 1990er Jahren.

Erhebungszeitraum	Region	Inzidenz	Referenz
1962 - 1975	Marburg / Lahn	3,0	Brandes (1983) ³⁰
1980 - 1984	Westliches Ruhrgebiet	4,0	Dirks, Goebell (1994) ⁸⁴
1980 - 1984	Essen	4,9	Timmer (1999) ²⁴⁵
1981 - 1984	Tübingen	4,0	Daiss (1989) ⁴⁷
1985 - 1986	Köln	5,1	Löffler, Glados (1993) ¹³⁵
1991 - 1995	Essen	5,2	Timmer (1999) ²⁴⁵

Tabelle 3: Morbus Crohn-Inzidenz in Deutschland pro 100 000 Einwohner pro Jahr

Ähnliches lässt sich auch für andere europäische Länder beobachten.^{136, 137, 201} Unabhängig vom zeitlichen Trend zeichnet sich eine geographische Varianz deutlich ab. Der Vergleich weltweit durchgeführter Studien erbringt Inzidenz- und Prävalenzgipfel in Nordeuropa, Großbritannien und Nordamerika¹³⁶ und lassen den Verdacht einer Korrelation der Inzidenz mit dem geographischen Breitengrad aufkommen.²²⁵ Bei näherer Untersuchung des vermeintlichen europäischen Nord-Süd-Gefälles in der „European Collaborative Study“ mit 20 beteiligten Zentren entlang der Nord-Süd-Achse zwischen Island und Israel, lässt sich dieses zwar bestätigen, ist aber weit weniger deutlich ausgeprägt als zunächst vermutet wurde.

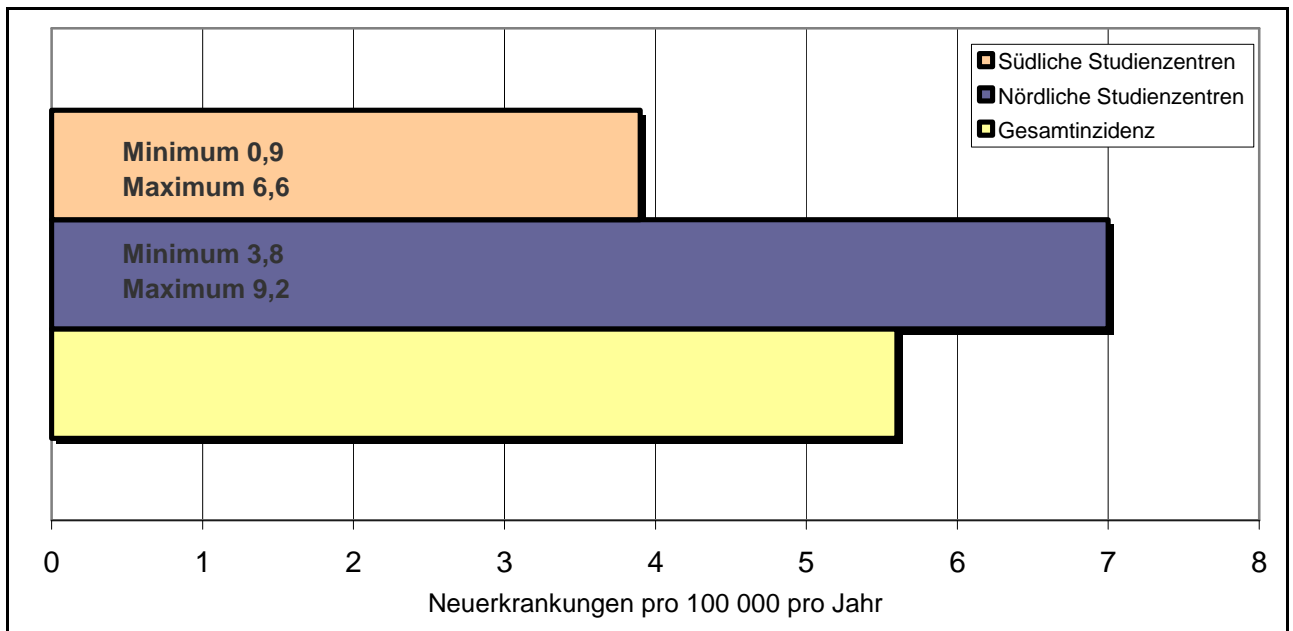


Abbildung 1: Das europäische Nord-Süd-Gefälle in der Inzidenz des Morbus Crohn (erstellt nach Shivananda)²²⁵

Dieses Nord-Süd-Gefälle scheint eher mit dem am Bruttosozialprodukt gemessenen sozio-ökonomischen Status als dem geographischen Breitengrad zu korrelieren.²²⁵ In den industriell fortgeschritteneren Zivilisationen im Norden ist gegenüber dem Süden mit i.d.R.

niedrigeren Bruttosozialprodukten das Erkrankungsrisiko um 80% erhöht.^{225, 230} Ein ähnliches Nord-Süd-Gefälle ist auch für die USA beschrieben^{201, 228} Ein weiteres erwähnenswertes epidemiologisches Phänomen stellt das in einigen Publikationen beschriebene Stadt-Land-Gefälle mit erhöhter Inzidenz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen in Stadtgebieten dar, welches mit zunehmender Bevölkerungsmobilität und fortschreitender Angleichung der Lebensweisen rückläufig ist.^{30, 47, 63, 116, 122, 228} Für die Interpretation ethnischer und rassebezogener Besonderheiten spielen v.a. Studien, die Immigranten berücksichtigen, eine bedeutende Rolle. Diese legen nahe, dass die scheinbar bestehenden ethnischen und rassischen Häufigkeitsunterschiede eher auf die Lebensweise und Umweltfaktoren, als auf die divergierende genetische Veranlagung, zurückzuführen sind.¹³⁶ Ähnliches ist hinsichtlich des raschen Inzidenzanstiegs innerhalb eines kurzen Zeitintervalls und der Nord-Süd- und Stadt-Land-Gradienten festzustellen. In einer Vielzahl an Studien sind einige dieser möglicherweise pathogenetisch bedeutsamen exogenen Faktoren, wie z.B. Rauchen, orale Kontrazeptiva, NSAR, Stillen, Appendektomie näher untersucht worden (Tabelle 4).

Die wichtigsten Aspekte zu untersuchten exogenen Faktoren
Rauchen
<ul style="list-style-type: none"> • Unumstrittenster Risikofaktor: positive Assoziation mit einer Erhöhung des Erkrankungsrisikos um das Zweifache bei MC, reziprok zur CU. • Erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines klinischen, chirurgischen und endoskopischen Rückfalls. • Größere Schwere des klinischen und endoskopischen Rezidivs. • Höheres Operationsrisiko bereits nach kurzem Krankheitsverlauf. • Ungünstige Effekte auf den Steroid- und Immunsuppressionsbedarf sowie die Influximab-Therapie • Progression des entzündlichen Verlaufs zu strikturierender und fistulierender Manifestation; mehr Fisteln und Abszesse • Osteoporose-Risikofaktor bei Frauen • Rückläufigkeit dieser Trends nach Aufgabe des Rauchens • Die Rolle des Passivrauchens ist noch nicht hinreichend geklärt.
Orale Kontrazeptiva
<ul style="list-style-type: none"> • Widersprüchliche Studienlage und somit allenfalls ein geringer Risikofaktor. • Keine signifikante Beeinflussung der Krankheitsaktivität. • Die ohnehin bestehende Hyperkoagulabilität bei aktiver chronisch entzündlicher Darmerkrankung wird verstärkt und somit das Auftreten thromboembolischer Ereignisse noch weiter begünstigt. • Die thrombogenen Eigenschaften der oralen Kontrazeptiva suggerieren eine pathogenetische Mitwirkung über multifokale mikrovaskuläre gastrointestinale Infarkte. • Erhöhtes Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen bei Langzeiteinnahme in Dosisabhängigkeit bzw. bei Einnahme von Höchstdosis-Östrogen-Präparaten in einigen Studien.
NSAR
<ul style="list-style-type: none"> • Weniger zweifelhafte Studienlage als bei den oralen Kontrazeptiva. • NSAR-Gebrauch ist klar mit einem höherem Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen verbunden, insbesondere besteht die Gefahr eines klinischen Rückfalls bei bereits Erkrankten.
Diätetische Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> • Bislang ist eine Assoziation zwischen chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Diät-Komponenten nicht sicher bewiesen. • Raffinierter Zucker, Schokolade, Cola, Margarine, Cornflakes, Kaugummi, Zahnpasta, Fette sind u.a. als potentielle diätetische Risikofaktoren untersucht worden, ohne einen schlüssigen Beleg für die Bedeutung diätetischer Faktoren liefern zu können. • Mögliche protektive Wirkung von Früchten, insbesondere Zitrusfrüchten, Gemüse und Fasern • Ernährungstherapieversuche zeigen sich weniger effektiv als traditionelle Therapieansätze.
Mikroorganismen
<ul style="list-style-type: none"> • Hygiene-Hypothese („<i>Sheltered Child</i>“): niedrige Inzidenz in Entwicklungsländern mit höherem Risiko für intestinale Infektionen; gute häusliche Hygiene, separate Toilette, Warmwasserleitung, Swimming Pool-Benutzung, Kleinfamilien als Risikofaktoren durch fehlenden Trainingseffekt • Infektionshypothese: Es sind immer wieder bestimmte Erreger in Diskussion, wie z.B. CMV, Masern, Mykobakterien. Bislang konnte aber kein bestimmtes kausales Pathogen identifiziert werden. Eine Reihe von Argumenten sprechen sogar gegen ein spezifisches infektiöses Pathogen (Tabelle 8). • Auch für in diesem Kontext untersuchte Impfungen (z.B. Masernimpfung) konnte keine eindeutige kausale Bedeutung festgestellt werden konnte. • Die Beteiligung der normalen kommensalen Mikroflora tritt im Rahmen des multifaktoriellen Entstehungskonzepts immer weiter in den Vordergrund (Tabelle 9).
Appendektomie
<ul style="list-style-type: none"> • Positive Assoziation zu MC, protektiv bei CU. • Eine Appendektomie nach einer perforierten Appendizitis scheint nach Ausbruch der Erkrankung einen aggressiveren Verlauf nach sich zu ziehen als bei Appendektomien aus anderen Gründen.
Stillen
<ul style="list-style-type: none"> • Inverse Assoziation des Stillen zu MC; frühes Abstillen als möglicher Risikofaktor mit geringer Evidenz

Tabelle 4: Untersuchte exogene Faktoren ^{24, 33, 49, 71, 116, 136, 223, 243, 244, 67}

Letztendlich kommen einige Parameter aus dem Bereich der Lebensgewohnheiten und dem Patientenumfeld als Krankheitsmitverursacher in Frage. Jedoch besteht allenfalls in Ausnahmen eine eindeutige Studienlage. Außerdem liefern epidemiologische Studien auch Anhaltspunkte für eine endogene Krankheitsveranlagung. So ist z. B. das Verhältnis zwischen erkrankten Männern und Frauen mit einer leicht weiblichen Prädominanz relativ ausgeglichen (Tabelle 5).

Referenz	Frauen : Männer	Lokalisation
Lee (1985) ¹²⁷	1,89 : 1	England
Lapidus (1997) ¹²⁶	1 : 1	Schweden
Lindberg (1991) ¹³²	1,15 : 1	Schweden
Kyle (1992) ¹²¹	1,34 : 1	Schottland
Löffler (1993) ¹³⁵	1,57 : 1	Deutschland
Shivananda (1996) ²²⁵	1,20 : 1	Europa
Lapidus (2001) ¹²⁵	1 : 1	Schweden

Tabelle 5: Geschlechtsverteilung.

Die leichte geschlechtsbezogene Verschiebung des Erkrankungsrisikos, v.a. in den jüngeren Altersgruppen (Abbildung 2), lässt an eine hormonelle Beteiligung an der Pathogenese denken. ¹³⁶ Allerdings zeigen auch einige Studien in Niedriginzidenz-Regionen reziproke Verhältnisse, so dass derzeit noch keine evidenten Schlussfolgerungen gezogen werden können. ¹³⁶

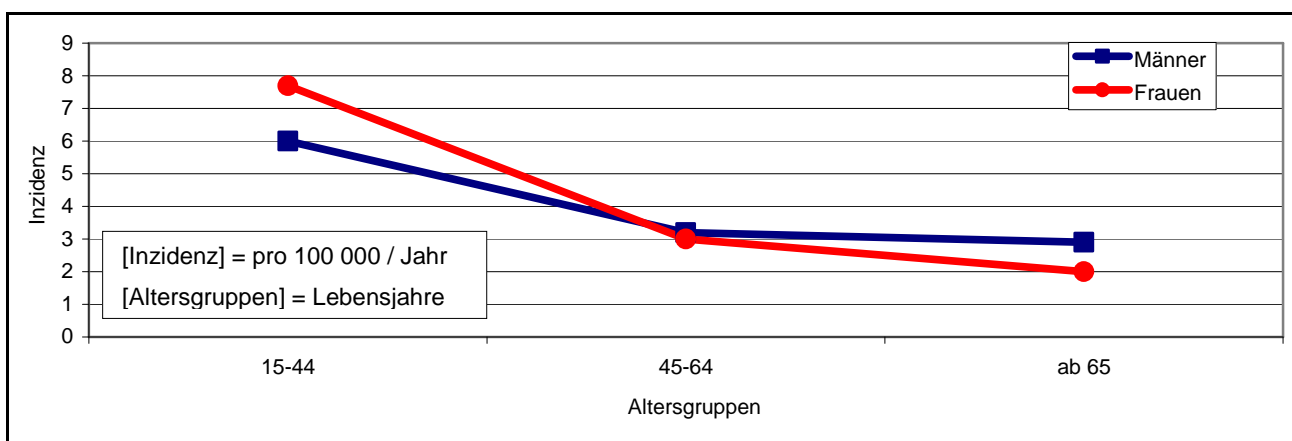


Abbildung 2: Altersabhängige Geschlechtsverteilung (erstellt nach Shivananda) ²²⁵

Die zentralen Aspekte in den aktuellen Publikationen hinsichtlich der Pathogenese des Morbus Crohn stellen jedoch inmitten der Vielzahl der erläuterten möglichen Cofaktoren die immunologische Dysregulation sowie die genetische Determination dar. Insbesondere liegt der mögliche Kausalzusammenhang zwischen diesen ätiologischen Komponenten im Fokus.

1.1.4 Genetik

Hinsichtlich der Ätiopathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen lenken viele verschiedene Beobachtungen das Augenmerk auf genetische Faktoren.²⁶ Der konkrete Verdacht auf eine genetische Krankheitsprädisposition, der in den nachfolgenden Jahrzehnten viele verschiedene Studien darüber anregte, entstand erstmals 1963 durch Kirsners Publikation "*Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis*" über die familiäre Häufung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.^{5, 117} Dieses beschriebene kumulierte intrafamiliäre Vorkommen geht mit einem erhöhten Risiko für Verwandte der Betroffenen - insbesondere ersten Grades - bei gleichzeitig geringem Risiko für Ehepartner einher. In 5 bis 32% der Fälle chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wird von einer positiven Familienanamnese berichtet.^{5, 151, 174, 202} Dazu reziproke Studien weisen ein 14- bis 15-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für Verwandte im Vergleich zur Normalbevölkerung auf.²⁶ Die Resultate verschiedener Zwillingsstudien, die in diesem Kontext eine besondere Bedeutung haben, bekräftigen die Verdachtsmomente für einen genetischen Hintergrund durch eine gesteigerte Konkordanz bei Monozygotie.^{5, 173, 239, 248} Zudem ist die Prävalenz bei nicht blutsverwandten Familienangehörigen, wie Ehepartnern und Adoptiveltern erkrankter Kinder, nicht erhöht. Dies unterstreicht die Beteiligung endogener Ätiologiefaktoren und spricht gegen eine ausschließlich umweltbedingte Krankheitsentstehung. Außerdem suggerieren die Diskrepanzen hinsichtlich Inzidenz und Prävalenz der verschiedenen Rassen und ethnischen Populationsgruppen eine Beteiligung genetischer Faktoren. Genauer betrachtet, zeigen epidemiologische Studien ein Prävalenzmaximum in der weißen Bevölkerung. Das geringste Vorkommen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen weisen dahingegen asiatische Populationen auf. Ein weiterer möglicher Anhaltspunkt aus der Epidemiologie für die Genetik stellt die Akkumulation in der jüdischen Bevölkerung dar. Dabei ist die Prävalenz innerhalb dieser ethnischen Gruppierung noch einmal bei Ashkenazim deutlich höher als bei Sephardim und orientalischen Juden. Diese epidemiologischen Beobachtungen können jedoch, wie bereits erwähnt, auch durch die verschiedenen Lebensgewohnheiten zustande gekommen sein. Die Daten der epidemiologischen Studien werden unterschiedlich interpretiert.^{26, 136}

Weitaus deutlichere Hinweise stellen die Kosegregation einer Vielzahl von Erkrankungen mit genetischen Ätiologiefaktoren bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, die Assoziation subklinischer genetikbezogener Marker - wie z.B. ASCA und das fäkale Calprotectin²⁴⁰ -, die Kandidatengene in den IBD-Loci sowie verschiedene Tiermodelle dar.

Hinweise für eine genetische Prädisposition
<ul style="list-style-type: none"> • Ethnische Unterschiede bei der Inzidenz und Prävalenz: Weiße haben die höchsten Prävalenzraten gegenüber schwarzen Amerikanern und Asiaten mit der niedrigsten Prävalenz. Akkumulation in der jüdischen Population (Ashkenazim > Sephardim und orientalische Juden)
<ul style="list-style-type: none"> • Familiäre Häufung: erhöhtes Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades Betroffener (5-32%) bei gleichzeitig niedrigem Risiko für Ehepartner und für Familienangehörige adoptierter Kinder mit CED
<ul style="list-style-type: none"> • Konkordanz in Zwillingsstudien: Gesteigerte Konkordanz bei Monozygotie (37%) versus Dizygotie (7%)
<ul style="list-style-type: none"> • Assoziation mit anderen Erkrankungen mit bekanntem genetischem Hintergrund, wie z.B. Morbus Bechterew⁵², Psoriasis, Ekzeme
<ul style="list-style-type: none"> • Assoziation zu Immundefizienzsyndromen mit CED-ähnlicher Enterocolitis: u.a. Wiskott-Aldrich-Syndrom^{8, 73}, Hermansky-Pudlak-Syndrom^{120, 207}, Turner-Syndrom^{94, 118}, Pachydermo-periostosis^{41, 224}, Glykogenspeicherkrankheit Typ 1b¹⁹⁸, primäre Hypogammaglobulinämie²⁴¹, x-chromosomale Agammaglobulinämie²⁵⁶
<ul style="list-style-type: none"> • Assoziation mit subklinischen Marker mit genetischem Hintergrund: ASCA / ANCA^{64, 152}, Anti-Omp-C²⁷⁰, fäkales Calprotectin (bei Verwandten ersten Grades erhöht)²⁴², HLA B27⁵²
<ul style="list-style-type: none"> • Identifikation der IBD Loci und der Suszeptibilitätsgene (Tabelle 7)
<ul style="list-style-type: none"> • Verschiedene genetische Mausmodelle: Knock-out Mäuse: TCR-α, MHCII, TGF-β, IL-2, IL-10, TNFΔARE Transgene Mäuse mit Überproduktion von krankheitsbeschleunigenden Faktoren wie STAT-4, IL-7, CD40L, TCR-$\alpha\beta$

Tabelle 6: Argumente für einen genetischen Hintergrund (modifiziert nach Bonen und Ahmad)²⁶

Diese Fülle an aufgezeigten Indizien lässt eine genetische Krankheitsdetermination als äußerst wahrscheinlich erscheinen. Trotzdem ist es bislang nicht gelungen, ein einzelnes verändertes Hauptgen als *conditio sine qua non* ausfindig zu machen. Dies weist auf komplexe genetische Zusammenhänge hin und spricht gegen das Vorliegen eines klassischen Erbgangs gemäß den Mendelschen Gesetzen. Es ist viel eher von einer Interaktion diverser Genmutationen bzw. –polymorphismen, im Sinne einer im Rahmen eines multifaktoriellen Grundgerüsts integrierten polygenen Vererbung, auszugehen.

Wiederholte systematische Untersuchungen des Genoms seit 1996 liefern bemerkenswert konsistente Suzeptibilitätsloci, die die sogenannten Kandidatengene umfassen.⁵ Es konnten bislang neun Regionen, *i.e.* IBD-Loci 1-9, auf den Chromosomen 1, 3, 5, 6, 12, 14, 16 und 19 mittels dieser genomweiten Kopplungsanalysen mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit identifiziert werden. Die exakten Suszeptibilitätsgene gelten allerdings nur für IBD1 und neuerdings auch IBD5 als erwiesen. Für die anderen reproduzierten chromosomalen Lokalisationen wird noch nach den entsprechenden Kandidatengenen gesucht. Darüberhinaus sind noch einige weitere verdächtige Genorte in diversen Studien beschrieben worden. Darunter auch DLG5 (*Drosophila Discs Large Homolog 5*) mit der chromosomalen Lokalisation 10q22-23, das zur Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere-Integrität dient.²³¹ Diese Assoziation konnte jedoch bislang nicht reproduziert werden.²⁴⁶ 2006 stellten Duerr et al. eine Assoziation zwischen dem IL23R-Gen auf Chromosom 1p31 fest.

Dieser Zusammenhang wurde in verschiedenen Replikationsstudien mit unabhängigen Kohorten bestätigt ⁶⁰, weswegen es sich hierbei vermutlich um einen zehnten IBD-Locus handelt. Viele Jahre fokussierte sich die Morbus Crohn-Forschung im Interleukin-Bereich allerdings auf das aus den zwei Untereinheiten p35 und p40 bestehende IL-12, da im Tiermodell p40-neutralisierenden Antikörpern eine Entzündungshemmung zugeschrieben wurde. Das heteromere Protein IL-23 besteht, neben dem biologisch inaktivem p19, jedoch ebenfalls aus dem Proteinbaustein p40. Studien mit entsprechenden Knockout-Mäusen zeigten, dass IL-23 bei der Entwicklung einer chronischen Entzündung eine größere Rolle spielt. Außerdem aktiviert IL-23 eine T-Zell-Subpopulation, die das Zytokin 17 aktiviert, welches den Haupttranskriptionsfaktor ROR γ t exprimiert und chronisch entzündliche Erkrankungen im Tiermodell vermittelt. ^{161, 172} Ebenso wird, neben IL23R, die Rolle weiterer unterschiedlicher genetisch degenerierter Interleukinrezeptoren in der aktuellen Literatur diskutiert. So beschreiben West und Schreiber in unabhängigen Untersuchungen z.B. eine Interleukin-4(-Rezeptor)-bedingte Störung der Downregulation proinflammatorischer Zytokine bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. ^{216, 259} Neben IBD1, IBD8 und IL-4R werden die E-Cadherine auf Chromosom 16 kodiert, welches als transmembranöses Glykoprotein an der intestinalen Barriere-Funktion beteiligt ist und in aktiv entzündeter Mukosa bzw. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hochreguliert ist. ^{54, 55, 98, 99} In erst kürzlich durchgeführten Genom-Screening-Studien bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurde das ATG16L1-Gen (*autophagy-related 16-like 1 gene*) entdeckt. Der SNP Thr300Ala war stark mit Morbus Crohn assoziiert. ^{88, 187, 197}

IBD-Loci				
Locus	Chromosom	Kandidatengen	Assoziierte Erkrankung	Referenzen
IBD1	16q13	NOD2	MC	37, 46, 87, 103-105, 130, 166, 261
IBD2	12q14	unbekannt	CU	46, 58, 89, 145, 181, 213, 262
IBD3	6p	unbekannt	CED	5, 57, 89, 90, 196, 213, 261, 264
IBD4	14q11-q12	unbekannt	MC	58, 59, 145, 183, 253
IBD5	5q31-33	SLC22A4/A5	MC	37, 145, 195, 196
IBD6	19p13	unbekannt	CED	196
IBD7	1p36	unbekannt	CED	37, 38
IBD8	16p12	unbekannt	MC	31, 213
IBD9	3p26	unbekannt	CED	213
	1p31	IL23R	CED	60, 197
		ATG16L1	MC	88, 187, 197
	5q13.1	„gene desert“ in der Nähe von PTGER4	MC	131

Tabelle 7: Wiederholt reproduzierte CED-Kopplungsregionen ^{26, 115, 162}

Bei dem bis heute am besten erforschten sowie bedeutendsten Prädispositionsgen handelt es sich um das erstmals 2001 beschriebene NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 2*) bzw. CARD15 (*caspase recruitment domain-containing protein 15*) auf Chromosom 16q12 im IBD1-Locus.^{87, 103, 104, 166} Es umfasst zwölf Exons, wovon elf Exons konstant sind und ein Exon fakultativ ist. Die Expression des Proteins NOD2, dessen Aufbau Abbildung 3 veranschaulicht, erfolgt in bestimmten immunkompetenten Zellen sowie in intestinalen Epithelzellen.^{86, 167}

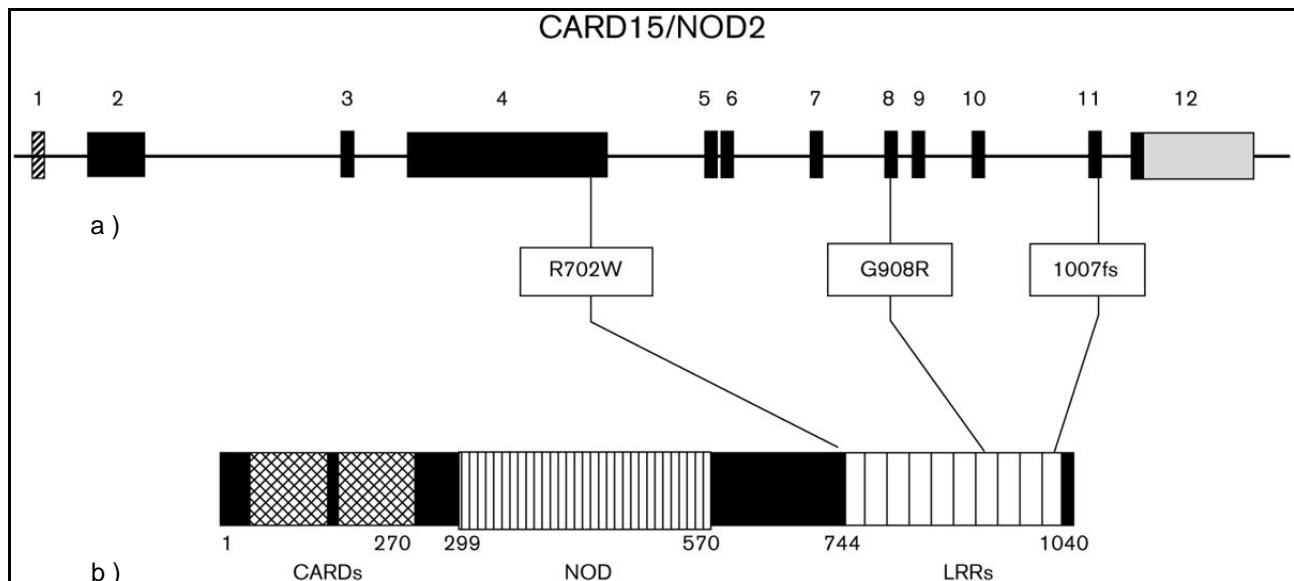


Abbildung 3: NOD2-Aufbau a) Das NOD2-Gen umfasst elf konstante Exons und ein fakultatives zwölftes Exon b) Das NOD2-Protein besteht aus zwei Caspase-rekrutierenden Domänen (CARDs), einer Nukleotid-bindungsdomäne (NBD) und zehn C-terminalen leucinreichen Wiederholungen (LRRs).¹⁰⁵

Das resultierende Protein ist durch seine hohe Bindungsaffinität zu Muramyldipeptid (MDP), einem Bestandteil sowohl gramnegativer als auch -positiver Bakterien, in die bakterielle Abwehr involviert. Veränderungen im NOD2-Gen können die intrazelluläre Detektion der kleinsten bioaktiven Einheit des Peptidoglykans, *i.e.* MDP, und damit die Aktivierung des proinflammatorischen NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B) über diesen Signalweg beeinträchtigen.^{83, 107} Die genauen Zusammenhänge zwischen NOD2-Varianten und der NF- κ B-Signaltransduktion ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Sowohl ein Funktionsverlust als auch ein –gewinn wurden in der Literatur beschrieben.¹⁶² Für Kaukasier sind bislang 30 Mutationen im NOD2-Gen beschrieben, die bei 50% der Crohn-Patienten kontrastierend zu einem Anteil von 20% bei gesunden Kontrollen zu finden sind; dabei repräsentieren Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC mehr als 80% der mutierten Chromosomen. Insgesamt kommen diese drei Hauptmutationen, die in Bezug zur LRR-Domäne stehen (Abbildung 3), bei 25 bis 35% der kaukasischen Morbus Crohn-Patienten

vor, was einer Häufigkeit von 7 bis 15% bei Gesunden gegenübersteht.^{105, 130} Die LRR-Domäne anderer Proteine, wie z.B. des Krankheitsresistenzproteins R der Pflanzen und der Toll-like-Rezeptoren, erkennt, gleichermaßen wie bei NOD2, Pathogenmolekülmuster und hat eine Schlüsselrolle in der Induktion des angeborenen Immunsystems inne.¹⁴⁶

1.1.5 Immunologische Pathogenese-Aspekte: Störungen der Immunantwort und der Mukosabarriere

Im Zusammenspiel mit den genetischen Faktoren sind angesichts der Komplexität des Immunsystems, Störungen auf verschiedenen Ebenen möglich, die sich aber auf zwei gegenteilige, bei genauerer Betrachtung jedoch nicht widersprüchliche, Funktionsresultate reduzieren lassen; so steht eine überschießende Immunreaktion einer Immundefizienz gegenüber.

Als Anhalt für die pathogenetische Beteiligung einer Immundefizienz lassen sich eine ganze Reihe kongenitaler Immundefektsyndrome anführen, die mit einer ähnlichen Manifestation wie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen einhergehen (Tabelle 6). Zum Beispiel zeigt die Morbus Crohn-ähnliche Enterokolitis im Rahmen einer Agammaglobulinämie eine, die Defizienz kompensierende Hochdosis-Immunglobulin-Therapie Besserung.⁷² Ähnliches lässt sich von der Gabe des „*granulocyte/macrophage colony stimulating factor*“ bei diversen Neutropenien berichten.⁷² Auch der erfolgreiche Einsatz immunstimulierender Therapiestrategien, wie z.B. Interferon, Levamisol und Bacillus Calmette Guerin (BCG) bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterstützt diese These.⁷² Zudem existieren einige Tiermodelle, mit denen die chronische Kolitis mit einer Abwehrschwäche in Verbindung gebracht werden kann. So entwickeln z.B. Mäuse mit einer Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASP)-Defizienz eine chronische Kolitis. Auch bei zahlreichen Mausmodellen mit genetisch manipulierter T-Zell-Funktion - TCR- α -/-, TCR- β -/-, Il-2 -/-, Il-2Ra -/-, Il-10 -/-, G- α_{i2} -/-, MHCII -/-, CD45Rbhi-Transfermodell - resultiert eine chronische Entzündung des Kolons.⁷² Ferner verbessert der Einsatz immunstimulatorischer DNA die klinischen, biochemischen und histologischen Aspekte der Darmentzündung bei Dextran-Natrium-Sulfat-induzierter Kolitis und Hapten-induzierter Kolitis bei BALB/c-Mäusen unabhängig von der zugrundeliegenden T-Zell-Antwort.⁷² In einigen Studien kann durch den Nachweis einer Komplementdysfunktion, einer beeinträchtigten Expression antibakteriell aktiver Peptide oder einer erhöhten Bakterienkonzentration, ein direkter Zusammenhang zwischen Morbus Crohn und der diskutierten reduzierten Immunkompetenz hergestellt werden.⁷² So schreiben Fellermann et al.⁶⁷, ausgehend von der Hygiene-Hypothese, einem Defensinmangel, d.h. einem Mangel an antibiotischen

mukosalen Peptiden, eine entscheidende Rolle in der Krankheitsentstehung zu. In ihrer Untersuchung zeigen sie eine Induktionsstörung der humanen Defensine beta 2 und 3 bei Morbus Crohn, die zu Änderungen der NF-κB-Transduktion führen. Von besonderem Interesse sei laut Fellermann et al auch die Verknüpfung der angeborenen und der erworbenen Immunität durch das Chemokin-Verhalten der Defensine und deren Fähigkeit zur Verstärkung der Immunantwort.⁶⁷

Die enterische Mikroflora stellt eine unabdingbare Kondition in der Krankheitsentstehung dar, obgleich die Schleimhautoberflächen des Gastrointestinaltraktes physiologischerweise von einer großen, dynamischen Ansammlung an Mikroorganismen besiedelt werden. Schon beim Gesunden sind bis zu zehn mal mehr Bakterien als Zellen im menschlichen Körper.²²² Die mikrobielle Dichte steigt dabei von proximal nach distal von 10^8 Bakterien pro Gramm im distalen Ileum auf 10^{11} - 10^{12} Mikroorganismen pro Gramm im Kolon.²¹⁴ Im Rahmen chronischer entzündlicher Prozesse ist eine erhebliche Erhöhung der ohnehin immensen bakteriellen Kolonisation nachzuweisen, wobei die Konzentrationsveränderungen überraschenderweise nicht in den entzündeten Bereichen, sondern in den intakten Mukosaabschnitten vorliegen.²³³ Die inflammatorischen Läsionen entstehen auch hauptsächlich in diesen Regionen mit der höchsten bakteriellen Anhäufung.²²² Hinsichtlich der Florazusammensetzung aus den diversen Bakterienspezies besteht jedoch prinzipiell kein Unterschied zwischen Gesunden und Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.²³³ Demzufolge lässt sich auch kein spezifischer Mikroorganismus als Krankheitsverursacher ermitteln. Im Gegenteil, es gibt eine Reihe an Argumenten, die gegen ein spezifisches infektiöses Pathogen sprechen.

Argumente gegen die Beteiligung eines spezifischen infektiösen Pathogens
<ul style="list-style-type: none"> • Scheinbar protektive Wirkung bestimmter Umweltbedingungen, die die Übertragung infektiöser Mikroorganismen eigentlich fördern, wie z.B. die Überbevölkerung, unhygienische Verhältnisse, endemische Parasiten
<ul style="list-style-type: none"> • Gene mit ursprünglich protektivem Effekt gegenüber Infektionserkrankungen können in einer hygienischen Umgebung zu Risikofaktoren avancieren.
<ul style="list-style-type: none"> • Mangel an überzeugenden Daten für die vertikale oder horizontale Transmission der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei Menschen
<ul style="list-style-type: none"> • Widerspruch zwischen therapeutischem Nutzen einer Langzeitimmunsuppression und der infektiologischen Genese
<ul style="list-style-type: none"> • Widersprüchliche oder unklare Studienlage hinsichtlich möglicher spezifischer Pathogene (vgl. Masernvirus, <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>)
<ul style="list-style-type: none"> • Die den Umwelttriggern zugeschriebenen veränderten epidemiologischen Trends können ohne ein übertragbares Pathogen erklärt werden.

Tabelle 8: Argumente gegen Infektionshypothese bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen²²³

Die Rolle luminaler Bakterienstämme im pathophysiologischen Konzept ist dagegen durch eine Reihe von Tiermodellen als gesichert zu betrachten.^{191, 210, 211} Eine keimfreie Umgebung stellt bei genetisch modifizierten Mäusen erwiesenermaßen einen Schutz vor der Entwicklung einer spontanen, den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ähnlichen Kolitis dar.^{218, 221} In der nachfolgenden Tabelle 9 sind die Aspekte, die die Bedeutung der normalen kommensalen Mikroflora bekräftigen, zusammenfassend dargestellt.

Beobachtungen für die Beteiligung der Mikroflora
• Entzündung in den Bereichen mit der höchsten Bakterienanzahl
• Umleitung des fäkalen Stroms wirkt sich positiv auf den Krankheitsverlauf aus.
• Rückfall nach der Wiederherstellung des fäkalen Stroms
• Nachweisbare Immunreaktivität gegen die Mikroflora bei Morbus Crohn
• Tendenz metabolischer Erkrankungen mit defekter mikrobizider Phagozytenfunktion zur Entwicklung Morbus Crohn-ähnlicher Läsionen, die auf Antibiotika oder Korrektur des Immundefekts ansprechen.
• Gesteigerte Bakterienenteroadhärenz und intramukosale Translokation bei Morbus Crohn
• Einfluss der bakteriellen Flora auf die Entwicklung und Funktion des Mukosaimmunsystems
• Günstige Effekte durch Manipulation der Mikroflora mit Antibiotika oder Probiotika.
• Unabhängig vom zugrundeliegenden Gendefekt bei verschiedenen CED-Tiermodellen ist die bakterielle Kolonisation für die Entzündungsentstehung unabdingbar.
• In Tiermodellen zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kann die Entzündung durch mit enterischen Bakterien reaktiven T-Zellen vermehrt werden; im Gegensatz zu auf diätetische und epitheliale Antigene reaktiven T-Zellen.
• Verknüpfung zu NOD2, das den multifaktoriellen Rahmen der Pathogenese aus Gen-Bakterien-Immunsystem-Interaktionen untermauert.

Tabelle 9: Argumente für eine Beteiligung der Mikroflora an der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen²²³

Die konkrete Beteiligung der Mikroflora lässt allerdings noch Raum für ambivalente Spekulationen. An dieser Stelle muss auch die Modellvorstellung der immunologischen Überreaktivität in Betracht gezogen werden. Das mukosale Immunsystem fungiert unter regelrechten Umständen als ein Sensor zur Aufrechterhaltung der enterischen Homöostase, die einem Zustand der kontrollierten Entzündung gleichkommt. Hierfür muss, bei gleichzeitig bestehender effektiver Abwehrkapazität gegenüber episodischen Pathogenbedrohungen, eine Reaktion auf Nahrungsantigene und die residentielle Mikroflora unterbleiben. Im Falle des Verlustes dieser erforderlichen Toleranz gegenüber den regulären luminalen Antigenen, unter der Prämisse der genetischen Anfälligkeit des Individuums, wird die Unterscheidung zwischen harmlosen Antigenen und zu bekämpfenden Pathogenen unmöglich. Die konsekutiv unangemessene Immunantwort könnte nun eine chronisch entzündliche Darmerkrankung auslösen. Störungen der epithelialen Barrierefunktion mit bakterieller Umverteilung in die Darmwand sowie Defekte in der mukosalen Reinigung mit nachfolgend verstärkter Mukosa-Adhärenz begünstigen diesen Prozess. Im Rahmen dieser inadäquaten Immunantwort, die zur Entstehung bzw. Aufrechterhaltung chronischer

Entzündungen führen kann, wird bestimmten Zytokinen eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Viele Jahre wurde dabei auf das proinflammatorische IL-12 fokussiert, da neutralisierende Antikörper gegen dessen Baustein p40 chronische intestinale Entzündungen im Morbus Crohn-Tiermodell supprimieren konnte. Neuere Studien messen mittlerweile jedoch IL-23, das ebenfalls p40 als Untereinheit beinhaltet, ein bedeutenderes Gewicht bei. IL-23 aktiviert mehr Effektorzellen als IL-12 und hat dadurch eine größere immunologische Bedeutung. Die nachfolgende Abbildung 4 veranschaulicht die ausgelösten Reaktionen dieser beiden Zytokine.¹⁶¹

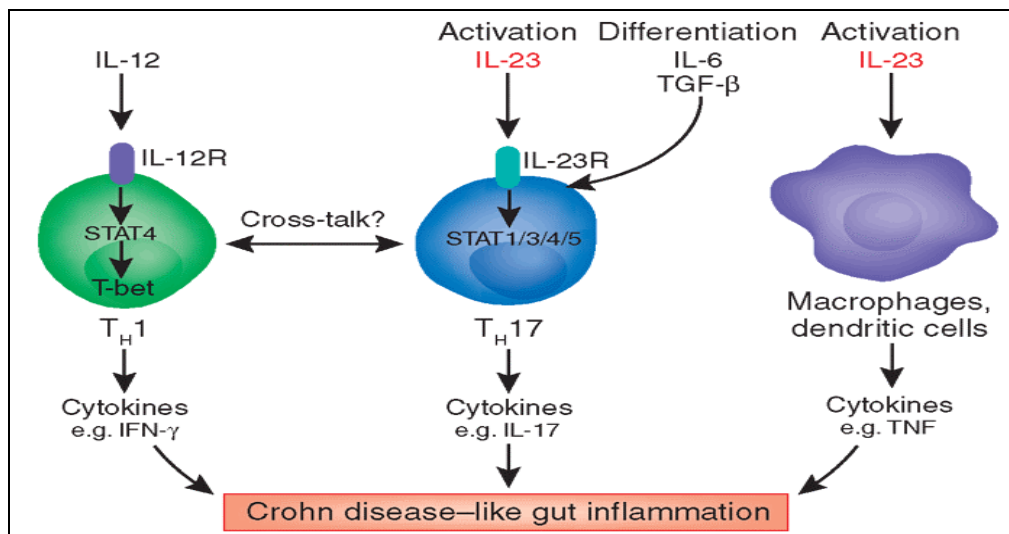


Abbildung 4: Gegenüberstellung der IL-12-Kaskade mit den IL-23-Kaskaden¹⁶¹

Der Ansatz der immunologischen Überreaktion wird durch den erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Eiern des intestinalen Helminthen *Trichuris suis* bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterstützt. In Ländern mit hohen Hygiene-Standards sind Helminthen-Infektionen selten, wohingegen in Gebieten mit einer höheren Inzidenz an parasitären Erkrankungen Krankheiten mit immunologischem Hintergrund wesentlich weniger häufig vorkommen. Die Hygiene-Hypothese, der zufolge das Immunsystem in den Industriestaaten durch ein selteneres Vorkommen an infektiologischen Erkrankungen kein ausreichendes Training erhält, stellt damit einen Grundpfeiler für die Entstehung einer immunologischen Überreaktion dar.²³² Um eine solche überschießende Immunantwort und eine unkontrollierte Entzündung durch Toleranzverlust zu vermeiden, müssen die epithelialen Zellen der gastrointestinalen Mukosa die Detektion molekularer Muster kontrollieren. Viele angeborene Immunreaktionen auf Pathogene sind durch eine bestimmte Rezeptorfamilie, den Toll-like Rezeptoren, vermittelt.^{148, 149}

1.2 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

1.2.1 Allgemeine Übersicht über TLRs

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind Homologe eines bestimmten transmembranalen Proteins der *Drosophila melanogaster*. Das im Begriff enthaltene „Toll“ ist eigentlich die Bezeichnung für ein Gen dieser Fruchtfliege, welches einerseits für die Ontogenese und andererseits für die Resistenz gegenüber Bakterien- und Pilzinfektionen von Bedeutung ist.¹¹ Das Toll-Gen steuert über den darin kodierten transmembranalen Rezeptor die dorsoventrale Polarisation während der frühen Entwicklungsphase der *Drosophila* und sorgt zudem bei der Larve sowie der entwickelten Fruchtfliege für die Induktion antimikrobieller Peptide im Rahmen der Infektionsabwehr.^{11, 12, 21, 128, 158} Auch die dazu homologe Säugetier-TLR-Familie aus derzeit elf Typ I Transmembranrezeptoren (Tabelle 10) hat eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunität inne. Dies spiegelt sich in der gemeinsamen Rezeptorgrundstruktur aus drei charakteristischen Komponenten, die in Abbildung 5 veranschaulicht wird, wieder.

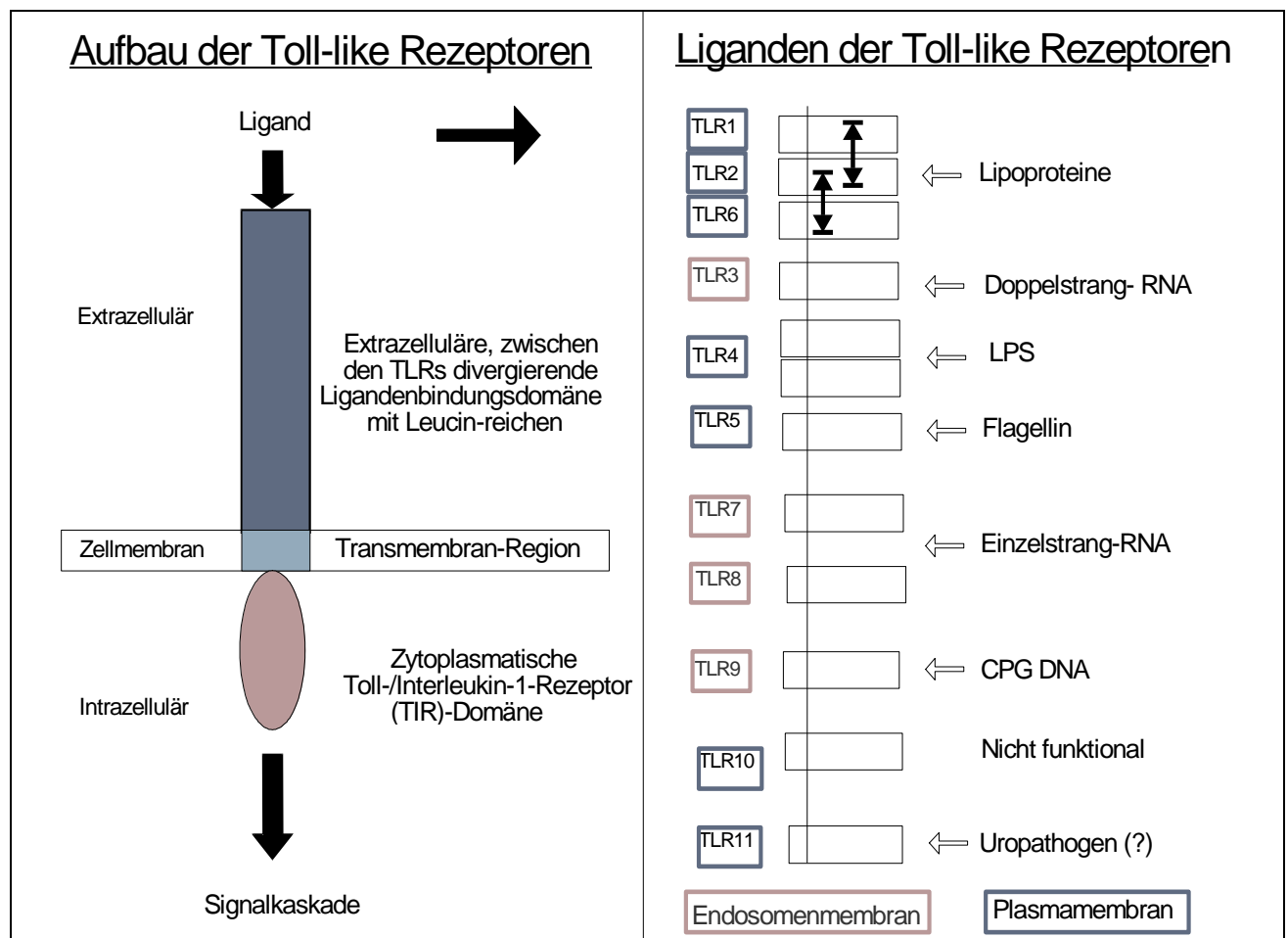


Abbildung 5: Aufbau der humanen TLR und ihre Liganden (erstellt nach Anderson, Takeda, Cario)¹¹.

Zur Erkennung der spezifischen Trigger besteht der extrazelluläre Rezeptoranteil aus einer innerhalb der TLRs divergierenden Ligandenbindungsdomäne mit sich wiederholenden leucin-reichen Sequenzen (LRR, *leucin-rich repeats*). Bei den über die LRR bindenden Agenzien handelt es sich um Lipide, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren und verschiedene Proteine, die allesamt als sogenannte „Pathogen assoziierte molekulare Muster“ (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) bezeichnet werden.²³⁷ Die verschiedenen Liganden divergieren zwischen den einzelnen TLR-Subtypen. So erkennen TLR 1, 2, 4, 5 und 6, die an der Plasmamembran lokalisiert sind, Zellwandkomponenten, wohingegen die in intrazellulären Kompartimenten befindlichen TLR 3, 7, 8 und 9 auf Nucleinsäuren reagieren.

Lokalisation und Liganden der bekannten TLR			
TLRx	Lokalisation ⁶¹	Ligand ³⁴	Referenz
TLR1	Plasmamembran	Bakterielle Triacyl-Lipopeptide	Ozinsky (2000) ¹⁷⁶
TLR2	Plasmamembran	Bakterielle Lipopeptide	Takeuchi (1999) ²³⁸
TLR3	Endosomenmembran	Doppelsträngige Virus-RNS und sense-Einzelstrang der Virus-RNS	Wang (2004) ²⁵⁵ Alexopoulou (2001) ⁹
TLR4	Plasmamembran	Bakterielles Lipopolysaccharid in Anwesenheit der erforderlichen akzessorischen Proteine (MD-2, CD14, LPS bindendes Protein); Fibrinogen, Heat shock proteine HSP 60 / 70, Fibronectin, Hyaluronsäure	Poltorak (1998) ¹⁸⁶ Rifkin (2005) ¹⁹⁴
TLR5	Plasmamembran	Flagellin	Hayashi (2001) ⁹³
TLR6	Plasmamembran	Bakterielle Diacyl-Lipopeptide	Ozinsky (2000) ¹⁷⁶
TLR7	Endosomenmembran	Antisense-Einzelstrang der Virus-RNS	Heil (2004) ⁹⁶ Lund (2004) ¹⁴⁴
TLR8	Endosomenmembran	Antisense-Einzelstrang der Virus-RNS	Heil (2004) ⁹⁶
TLR9	Endosomenmembran	Unmethylierte doppelsträngige cpg-DNS	Tabeta (2004) ²³⁵ Hemmi (2000) ⁹⁷
TLR10	?	Kein spezifischer Ligand derzeit bekannt, aber Assoziation zum gemeinsamen TIR-Adaptor MyD88	Hasan (2005) ⁹²
TLR11	-	Uropathogene Bakterien in Unkenntnis eines spezifischen Liganden bei Mäusen; im Kontrast dazu existiert kein humanes TLR11-Protein durch ein Stopp-Codon im TLR11-Gen	Zhang (2004) ²⁶⁸

Tabelle 10: Liganden der humanen Toll-like Rezeptoren (erstellt nach Dunne und Cario)^{61, 34}

Über eine kurze transmembranöse Region besteht eine Verknüpfung zur zytoplasmatischen Toll- / Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne, die die Toll-Signalkaskade über Interaktionen mit Adaptorproteinen iniiert.^{102, 186} Die TIR-Domäne besteht aus ungefähr 160 Aminosäuren und enthält drei bedeutende Strukturregionen, die unter anderem der TLR-Dimerisierung und der Bindung an nachgeschaltete Transduktionselemente dienen.¹⁶⁹ Derzeit sind beim Menschen mindestens fünf TIR-Domänen-enthaltende Adaptorproteine identifiziert, die die Toll-like-Rezeptoren mit den nachgeschalteten Prozessen koppeln: MyD88, Mal (TIRAP), TRIF (TICAM-1), TRAM (Tirp / TICAM-2) und SARM.³⁴ Die

Signalkaskaden nahezu aller Toll-like-Rezeptoren – mit Ausnahme von TLR3 - sind mit dem TIR-Domänen-enthaltenden Adaptorprotein MyD88 verknüpft. Die dadurch ausgelöste Kaskade mündet bei Triggerung der TLR 1, 2, 6, 4 und 5 in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der die Produktion inflammatorischer Zytokine, wie TNF, COX2 und IL-16, reguliert. Abweichend davon ist MyD88 bei TLR 7,8 und 9 über den direkten Weg mit TRAF6 und IRF-5 bzw. IRF-7 involviert und induziert die IFN- α -Synthese. Eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion ist für TLR4 und TLR3 bekannt, dabei wird u.a. über TRIF und IRF-3 der IFN- β -Promotor aktiviert.^{61, 236} Abbildung 6 zeigt die Kaskaden der verschiedenen TLRs nach Bindung der triggernden Liganden. Auch die Rolle der einzelnen Adaptorproteine ist ersichtlich. Über das TIR-domänen-enthaltende SARM existieren derzeit noch wenige Kenntnisse. Das 690 Aminosäuren umfassende Protein besitzt große Ähnlichkeit mit Proteinen der *Drosophila melanogaster* und der Nematode *Caenorhabditis elegans* und verfügt desweiteren über die interaktionsfähigen Domänen SAM (*sterile α motif*) und ARM (*Armadillo repeat motif*), was eine Rolle in der Signaltransduktion möglich erscheinen lässt.¹⁶⁹

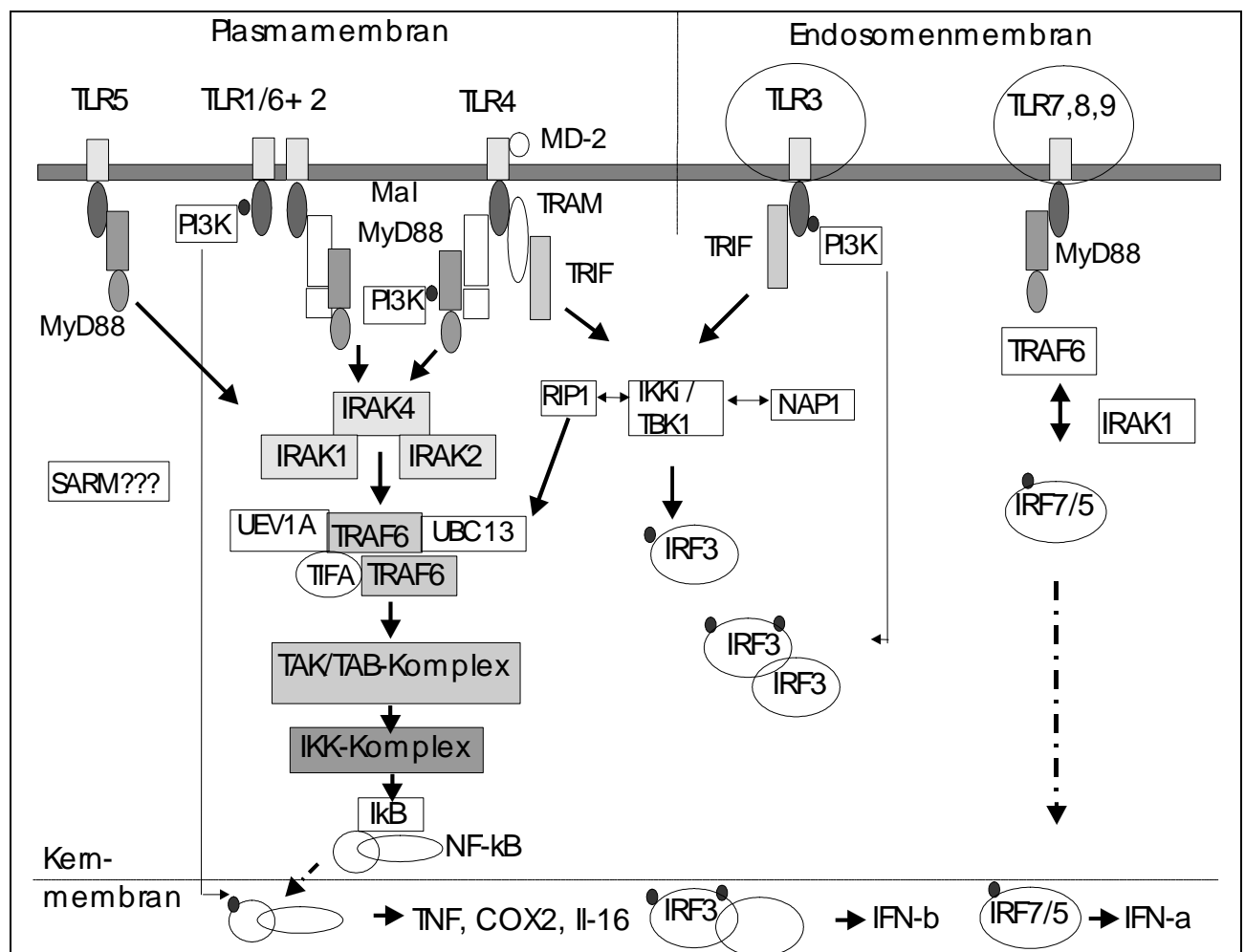


Abbildung 6: TLR-Signalkaskade (modifiziert nach Dunne, Takeda, O' Neill)^{61, 169, 236}

Zum Schutz vor einer überschießenden Immunreaktion existieren verschiedene Regulatorproteine, die an verschiedenen Stellen dieser TLR-Signalkaskaden ihre inhibierende Wirkung entfalten. Die Tabelle 11 gibt eine kurze Übersicht über den aktuellen Stand der darin involvierten Proteine.

Negative Regulation der Toll-Signalkaskade	
IRAK-M	Inhibition der Dissoziation von IRAK 1 und 4 vom MyD88-Rezeptorkomplex
SOCS1	Assoziation mit IRAK1, aber genauer Mechanismus unklar
MyD88s	MyD88 Spleissvariante ohne intermediäre Domäne Keine Bindung an IRAK4, keine Induktion der IRAK1-Phosphorylierung
SIGIRR	Membrangebundenes Molekül mit TIR-Domäne; vorübergehende Interaktion mit TLR4, IRAK1 und TRAF6
ST2	Membrangebundenes Molekül mit TIR-Domäne; Assoziation mit MyD88 und TIRAP

Tabelle 11: Protektive Regulation der Toll-Kaskade ⁷

Die TLR-Signalkaskade funktioniert demnach über ein komplexes Zusammenspiel zahlreicher Proteine. Die Basis der dafür unabdingbaren Proteinsynthese liegt in den dafür kodierenden Genen, die diverse Mutationen aufweisen können. Die Toll-like-Rezeptoren als immunologische Proteine sind demzufolge auch im genetischen Kontext zu betrachten. Somit verbindet die Entität der TLR-Rezeptoren die beiden relevantesten Pathogenesekomplexe für chronisch entzündliche Darmerkrankungen – Genetik und Immunologie. Insbesondere rückt damit auch der Toll-like-Rezeptor-Subtyp 4 mit seinem klassisch-mikrobiologischen Liganden Lipopolysaccharid in den Fokus. Dies wird zusätzlich durch das TLR4-Expressionsmuster auf Zellen der angeborenen Immunität untermauert. So fällt insbesondere eine starke TLR4-Expression auf Monozyten / Makrophagen auf. ¹⁵⁷ Außerdem konnte eine deutliche Hochregulation in mikroglialen Gefäßstrukturen sowie auf Astrozyten-Zelloberflächen bei der inflammatorischen Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose festgestellt werden. ³² Auch im Zusammenhang mit Myasthenia gravis wurde von einer Erhöhung der TLR4-Proteinsynthese berichtet. ²² Noch nachdrücklicher legen die Resultate von Cario und Podolsky eine TLR4-Beteiligung bei der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nahe: Der Nachweis einer offensichtlich gesteigerten Expression in Dünn- und Dickdarmepithelzellen bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten steht einer kaum erfassbaren Anzahl an TLR4 bei gesunden Kontrollen gegenüber. ³⁵

1.2.2 TLR4 und seine Polymorphismen

Bei der Sequenzierung des Toll-like-Rezeptors 4 sind bislang bis zu 29 verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms, SNP*) festgestellt worden. Die Mehrzahl dieser Genvarianten ist jedoch selten, weshalb auch keine Aussage zu daraus resultierenden funktionellen Konsequenzen und Krankheitsassoziationen getroffen werden kann.¹⁹⁰ Die Allelvarianten Asp299Gly (Nukleotidposition 12874) und Thr399Ile (Nukleotidposition 13174) im Exon 3 sind die zwei am häufigsten vorkommenden TLR4-SNPs, die in Aminosäuresubstitutionen resultieren. So wird einerseits Asparagin durch Glycin und andererseits Threonin durch Isoleucin in der extrazellulären LRR-Domäne ersetzt.^{34, 227} Diese Parallele zum bedeutendsten Morbus Crohn-Prädispositions-gen NOD2, dessen Hauptmutationen ebenfalls im LRR-Bereich liegen, macht Asp299Gly und Thr399Ile u.a. hinsichtlich der Morbus Crohn-Pathogenese äußerst interessant (Abbildung 7).

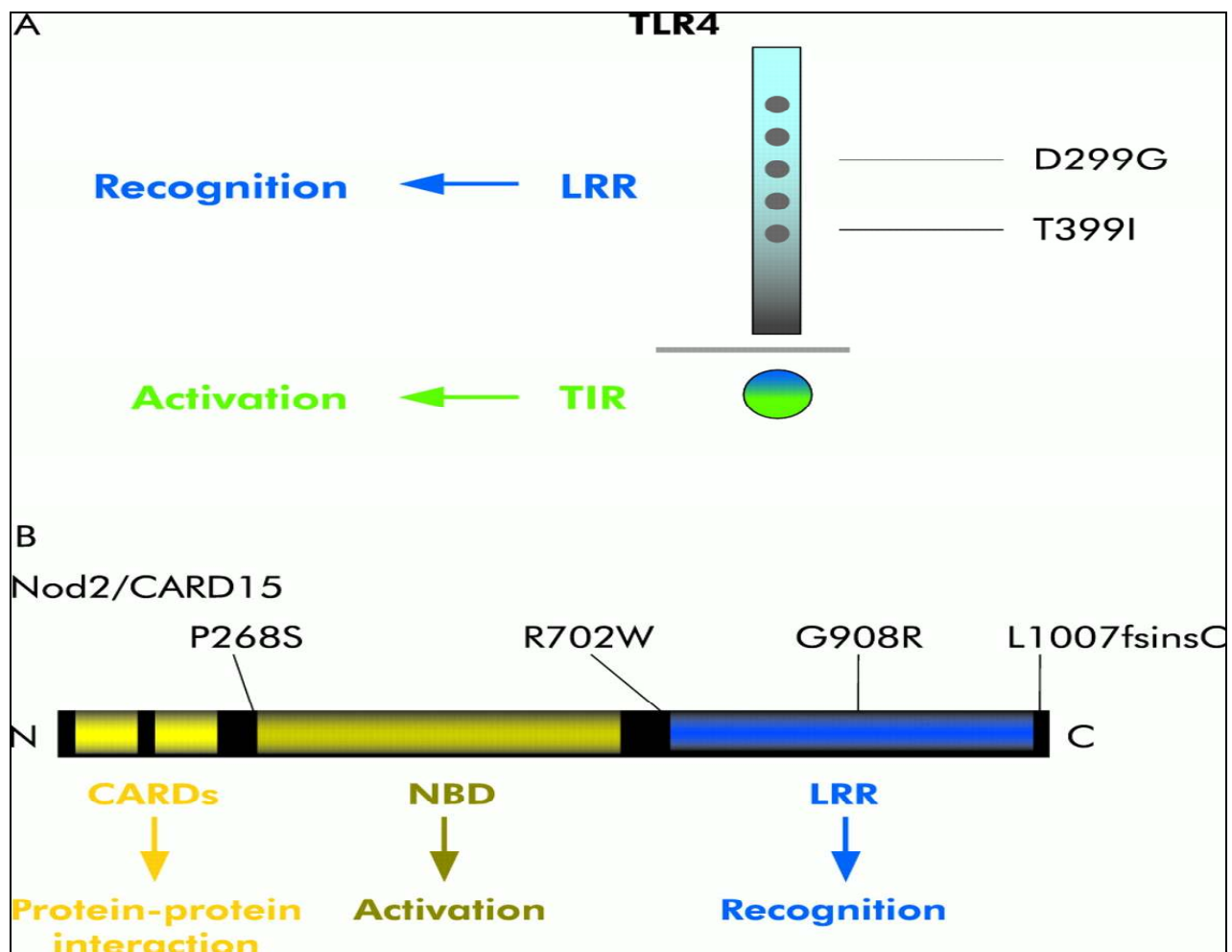


Abbildung 7: Strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen NOD2 und TLR4³⁴

Bei genauerem Vergleich dieser beiden Rezeptoren fallen einige weitere möglicherweise ätiopathogenetisch-relevante Gemeinsamkeiten auf, die in Tabelle 12 kurz erläutert werden.

Parallelen zwischen dem intrazellulären NOD2 und dem extrazellulären TLR4
<ul style="list-style-type: none">• Immunologische Bedeutung von NOD2 und TLR bei der Pathogenabwehr, der Immuntoleranz, dem Schutz der intestinalen Barriere-Funktion und der Aufrechterhaltung der mukosalen Homöostase.
<ul style="list-style-type: none">• NOD2 und TLR4 gehören beide zu den Mustererkennungsrezeptoren PRR, die über LRR-Domänen sogenannte PAMPs erkennen.
<ul style="list-style-type: none">• Die jeweiligen genetischen Hauptveränderungen liegen in der LRR-Domäne, die zur Ligandenerkennung und somit zur Signaltransduktion bedeutend ist.
<ul style="list-style-type: none">• Die Liganden MDP (NOD2) und LPS (TLR4) sind beide bakterielle Zellwandkomponenten.
<ul style="list-style-type: none">• Ligandenbindung aktiviert die Sekretion pro-/antiinflammatorischer Zytokine und / oder apoptotischer Kaskaden
<ul style="list-style-type: none">• Die Expression erfolgt konstitutiv oder induzierbar von vielen verschiedenen Zelltypen im gesamten Gastrointestinaltrakt.

Tabelle 12: Gemeinsamkeiten von NOD2 und TLR4 ^{28, 34}

Außerdem lassen murine Colitis-Modelle einen Zusammenhang zwischen TLR4-Polymorphismen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermuten. ^{102, 186} Desweiteren werden für eine Reihe aus dem infektiologischen bzw. immunologischen Erkrankungsgebiet Assoziationen diskutiert (Tabelle 33, S. 54).

1.3 Ziel der Arbeit

Die Ziele der Erforschung der genetischen Krankheits Hintergründe, die auch dieser Arbeit zugrunde liegen, sind, neben einem erweiterten Verständnis der Pathophysiologie, das Erkennen von krankheitsgefährdeten Personen, die Abschätzung des Krankheitsverlaufes und eine Therapieoptimierung durch die Entwicklung einer auf Genotyp-Phänotyp-Basis erstellten Krankheitsklassifikation. Als Beitrag zum Erreichen der genannten Ziele sollen in dieser Arbeit nun speziell die TLR4-Polymorphismen als potentielle ätiopathogenetische Aspekte beleuchtet werden. Im Detail ist es Ziel dieser Studie anhand von aus Morbus Crohn-Patienten und vergleichbaren gesunden Kontrollen bestehenden Kollektiven etwaige Verteilungsunterschiede der beiden in der Bevölkerung häufigen Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile zu ermitteln. Die Untersuchung des Genoms der Studienteilnehmer auf besagte Aminosäuresubstitutionen erfolgt nach Isolierung und Amplifizierung durch entsprechend dafür geeignete Restriktionsendonukleasen. Zudem sollen genotyp-spezifische Besonderheiten durch die zusätzliche detaillierte Erhebung klinischer Daten nach den Vorgaben der Vienna-Klassifikation – z.T. auch darüber hinaus gehend - aufgedeckt werden. Ferner wird nach möglicherweise existierenden Asp299Gly- und Thr399Ile-Phänotyp-Profilen gesucht. Zur besseren Abschätzung der Bedeutung des potentiellen Risikofaktors TLR4 werden in die Auswertung die drei häufigsten NOD2-Mutationen Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC hinzugezogen.

2 Methodik

2.1 Untersuchungskollektive

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt. Alle Teilnehmer der Studie gaben nach entsprechender Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis für die genetische Analyse ihres Blutes. Das untersuchte Patientenkollektiv schließt 204 Patienten mit gesichertem Morbus Crohn ein. Die Diagnosestellung erfolgte entsprechend etablierter klinischer Leitlinien sowie endoskopischer, radiologischer und histopathologischer Kriterien. Fälle mit Colitis indeterminata wurden aus der Studie ausgeschlossen. Der Altersmittelwert zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt in der Studienkohorte bei $27,6 \pm 11,4$ Jahren mit einer durchschnittlichen Erkrankungsdauer von $10,2 \pm 8,2$ Jahren zum Studien-Zeitpunkt. Das Kontrollkollektiv umfasst 199 gesunde, nicht miteinander verwandte Kontrollen kaukasischen Ursprungs. Die Kontrollen sind bezüglich des Geschlechts an die Morbus Crohn-Kohorte angeglichen. Der Männeranteil beträgt bei den Kontrollpersonen 49,8% gegenüber 47,1% in der Patientengruppe.

	Morbus Crohn (n=204)	Kontrollen (n=199)
Geschlecht		
Männlich (%)	96 (47,1%)	99 (49,8%)
Weiblich (%)	108 (52,9%)	100 (50,2%)
Lebensalter (a)		
Mittelwert \pm SD	$37,8 \pm 11,8$	$46,4 \pm 15,3$
Spannweite	15 - 73	21 - 84
Alter bei Erstdiagnose (a)		
Mittelwert \pm SD	$27,6 \pm 11,4$	—
Spannweite	7 - 71	—
Median	24	—
Krankheitsdauer (a)		
Mittelwert \pm SD	$10,2 \pm 8,2$	—
Spannweite	0 - 41	—
Median	8,5	—
CED- Familienanamnese (%)		
Positiv	27 (13,2%)	—
Negativ	179 (7,7%)	—

Tabelle 13: Demographische Daten der Morbus Crohn- und Kontroll-Population

Die Erhebung der demographischen und klinischen Daten, inklusive Krankheitsverlauf und -lokalisierung, Morbus Crohn-bezogene Komplikationen und die Verordnung einer immunsuppressiven Therapie (Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat oder Infliximab) – basiert einerseits auf einer retrospektiven Analyse der Patientenakten und andererseits auf einem detaillierten Fragebogen. Die Erfassung sämtlicher Phänotyp-Parameter erfolgte bezüglich der genetischen Merkmale geblindet. Um eine vergleichbare Korrelation zwischen

Phänotyp und Genotyp durchführen zu können, war eine Unterteilung der heterogenen Entität Morbus Crohn in standardisierte Subgruppen erforderlich. In internationalen Studien zur Morbus Crohn-Genetik wurde hierfür zum Zeitpunkt des Studienbeginns zumeist die Vienna-Klassifikation ⁷⁹ angewendet. Das Patientengut wird dabei durch die drei Achsen Alter bei der Erstdiagnose (A, age), Krankheitsverlauf (B, behaviour) und –lokalisierung (L, localisation) in 24 verschiedene Subgruppen unterteilt.

Alter bei Erstdiagnose (A)	Lokalisation (L)	Krankheitsverlauf (B)
A1 < 40 Jahre A2 ≥ 40 Jahre	L1 terminales Ileum L2 Kolon L3 Ileokolon L4 oberer Gastrointestinaltrakt	B1 nicht-strikurierend, nicht-penetrierend B2 strikturierend B3 penetrierend

Tabelle 14: Vienna-Klassifikation ⁷⁹

Das Alter ist als das Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Hilfe radiologischer, endoskopischer, pathologischer oder chirurgischer Verfahren definiert. Der Lokalisationsunterteilung wird die maximale Krankheitsausbreitung vor der ersten Resektion zugrunde gelegt. Die weitere Klassifikation in die vier L-Subgruppen erfolgt nach den in Tabelle 15 genannten Merkmalen.

Lokalisation	Definition
L1	Beschränkung auf das terminale Ileum
L2	Jede Manifestation zwischen Coecum und Rektum ohne Beteiligung des Dünndarms oder des oberen Gastrointestinaltraktes
L3	Manifestation im terminalem Ileum bei zusätzlicher Befallslokalisierung zwischen Colon ascendens und Rektum
L4	Jeglicher Befall oberhalb des terminalen Ileums unabhängig von der sonstigen Krankheitsausbreitung

Tabelle 15: Definition der Lokalisationsklassifikation ⁷⁹

Der Krankheitsverlauf wird bei diesem System über das Auftreten von Komplikationen beurteilt.

Krankheitsverlauf	Definition
B1	Entzündlicher Erkrankungsverlauf ohne Komplikationen
B2	Konstante luminale Verengung mit prästenotischer Dilatation oder Obstruktionszeichen ohne Merkmale eines penetrierenden Krankheitsverlaufs; gesichert durch radiologische, endoskopische oder chirurgische Maßnahmen
B3	Intraabdominelle oder perianale Fisteln, Konglomerattumoren, Abszesse oder perianale Ulzera

Tabelle 16: Definition der Komplikationsklassifikation ⁷⁹

Zusätzlich zur Unterteilung der Kohorte nach Vienna wurden gesondert Daten zu den Morbus Crohn-typischen Komplikationen Strikturen, Fisteln und Abszessen, sowie zu Exazerbationen außerhalb des Gastrointestinaltraktes erhoben. Als extraintestinale Manifestationen und Begleiterkrankungen wurden Beschwerden der Gelenke, der Augen und der Haut in die Auswertung miteinbezogen. Im Bereich der Gelenke wurden ferner Arthritiden, Arthropathien Typ I bzw. II, sowie als gesonderter Parameter die ankylosierende Spondylitis berücksichtigt. Überdies wurden Daten zur Osteoporose als Begleiterscheinung und Nebenwirkung einer Steroidtherapie erhoben. Als Augenbeteiligung wurden die für Autoimmunerkrankungen typischen Entzündungen Uveitis (Iritis / Iridozyklitis) und Episkleritis gewertet. Im Bereich der Haut galten Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum und Psoriasis. Ferner wurde zusätzlich noch die Anamnese bezüglich der Koexistenz einer primär sklerosierenden Cholangitis und einer sekundären AA-Amyloidose erhoben.

2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nach Saiki et al.²⁰⁵ ist eine bedeutende Methode der Molekulargenetik zur *in vitro* Amplifikation von selektiven Nukleinsäure-Abschnitten. Sie besteht grundsätzlich aus den drei Teilschritten Extraktion, Amplifizierung und Detektion. Für die Amplifikation der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile mittels PCR wurde aus Vollblut isolierte DNA verwendet, weshalb im Folgenden die Isolierung der DNA aus selbigem erläutert werden soll.^{56, 217}

2.2.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der genomischen DNA aus Leukozyten des peripheren Bluts wurde das QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen GmbH (Hilden) in der Spin-Variante - mit einer Mikrozentrifuge – verwendet.ⁱⁱ Bei dieser Methode können durch die drei Abschnitte der Prozedur durchschnittlich 6 µg protein- und kontaminationsfreie DNA in 200 µl Wasser aus 200 µl Vollblut gewonnen werden. Die so isolierte und gereinigte DNA kann sofort benutzt werden oder in Buffer AE bei -20 °C zur späteren Verwendung gelagert werden. Zur Lyse der korpuskulären Blutbestandteile werden 20 µl QIAGEN Protease auf den Boden eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes für Mikrozentrifugen pipettiert (Eppendorf, Hamburg; Pipetman, Gilson, Bad Camberg). Anschließend werden 200 µl des zu untersuchenden Vollbluts und 200 µl des

ⁱⁱ QIAamp®DNA Blood Mini Kit: QIAamp Spin Column, QUIAGEN-Protease, Elutionspuffer AE, Lysispuffer AL, Waschpuffer AW1/AW2

Lysepuffers Buffer AL hinzugefügt und sofort für 15 s auf einem Vortex kräftig geschüttelt um eine homogene Lösung zu erhalten, die dann für 10 Minuten bei 56 °C im Heizblock (Lab-Line Inc., Illinois/ USA) inkubiert wird. Die nachfolgende kurze Zentrifugation (Eppendorf, Hamburg) dient dazu, bei der gleichzeitigen Isolierung der DNA verschiedener Blutproben, die Kreuzkontamination durch Spritzer an der Deckelinnenseite beim Öffnen der Gefäße zu vermeiden. Es werden nun 200 µl Ethanol (Merck, Darmstadt) zum Ansatz dazugegeben und mit 15 sekündigem kräftigem Schütteln damit vermischt. Wieder können Proben-Kreuzkontaminationen durch eine erneute kurzen Zentrifugation vermieden werden. Der Probenansatz kann jetzt in eine QIAamp Spinsäule umgefüllt werden und muss wiederum für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation wird die Spinsäule auf ein sauberes Auffanggefäß – 2 ml Collection-Tube - gesetzt. Die benutzten Auffanggefäße werden sowohl bei diesem Prozedurschritt als auch beim Waschen mitsamt Filtrat verworfen. Zum Waschen des Ansatzes werden 500 µl Buffer AW1 in die Spinsäule hinzugefügt, die anschließend für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert wird. Danach wird die Spinsäule auf ein sauberes 2 ml Collection-Tube als Auffanggefäß gesetzt. Zum weiteren Waschen werden 500 µl Buffer AW2 verwendet. Die Spinsäule wird für drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert und im folgenden in ein sauberes 1,5 ml-Collection-Tube als Auffanggefäß gesetzt. Zur Elution in das Auffanggefäß werden 200 µl des Elutionspuffers Buffer AE auf die Säule gegeben. Zum Prozedurabschluss erfolgt eine einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine ebenfalls 60 s dauernde Zentrifugation bei 8000 rpm. Die eluierte DNA kann anschließend direkt für die PCR verwendet werden.¹⁸⁸

2.2.2 DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation der isolierten DNA wird ein bestimmter Standardreaktionsansatz benötigt, der neben der DNA u.a. ausgewählte Primer, Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP, Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot) und eine thermostabile DNA-Polymerase erfordert. Primer sind DNA-Oligonukleotide, die als gegenläufig orientiertes Startermolekülpaar den zu vervielfachenden DNA-Abschnitt flankieren und dessen Existenz im untersuchten Genom in bestimmten Fällen sogar schon allelspezifisch nachweisen.

Die Primer für die untersuchten Asp299Gly-, Thr399Ile-Polymorphismen sind so konstruiert, dass sie eine Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutation auf den entsprechenden Allelen ermöglichen. Die Differenzierung erfolgt in diesen PCR-Ansätzen allerdings nicht über allelspezifische Primer, sondern durch die Amplifikation möglicher Schnittstellen für den jeweils nachfolgenden Restriktionsendonukleasenverdau. Die Auswahl der TLR4-Primer

erfolgte, mit einer Ausnahme (*Tabelle 17), nach E. Lorenz et al.¹³⁸. Für den Thr399Ile-PCR-Ansatz war eine Modifikation des antisense-Primers erforderlich.

Verwendete Primer			
TLR4 Asp299Gly	Vorwärts	5'-GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCC <u>ATG</u> -3'	Sigma, Taufkirchen
	Rückwärts	5'-GATCAACTTCTGAAAAAGCATTCCCAC-3'	Sigma, Taufkirchen
TLR4 Thr399Ile	Vorwärts	5'-GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTTGGGAG <u>AA</u> -3'	Sigma, Taufkirchen
	Rückwärts*	5'-GCAACTCTGGTGTCAAGTATGAGAAATGTC-3'	ThermoHybaid, Dreieich

Tabelle 17: Verwendete PCR-Primer

Die Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP sind sozusagen die Bausteine für die DNA-Polymerase, mit denen der Primer komplementär zum vorliegenden Einzelstrang (Template-DNA) verlängert wird. Die verwendete DNA-Polymerase muss hitzestabil sein, damit bis zum Ende der PCR ausreichend funktionstüchtiges Enzym im Ansatz vorhanden ist. Bei den zur Untersuchung der TLR4-Polymorphismen verwendeten Enzymen handelt es sich um die Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Abgene, Hamburg). Außerdem gehören noch Magnesiumchlorid und der vom Hersteller mitgelieferte Reaktionspuffer zum PCR-Ansatz (Abgene, Hamburg). Der PCR-Ansatz zum Nachweis der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile setzt sich demgemäß im Detail folgendermaßen zusammen:

Menge pro Probe [µl]	PCR für Asp299Gly	PCR für Thr399Ile
5	DNA	DNA
5	dNTP 125µM	dNTP 125µM
1	TLR4Asp299Gly-sense 20µM	TLR4Thr399Ile-sense 20µM
1	TLR4Asp299Gly anti-sense 20µM	Modifizierter TLR4Thr399Ile-antisense 20µM
0,25	thermostabile Thermo-Start®DNA-Polymerase	thermostabile Thermo-Start®DNA-Polymerase
5	Thermo Start 10x Reaction Buffer	Thermo Start 10x Reaction Buffer
3	MgCl ₂ 25mM	MgCl ₂ 25mM
30	Aqua bidest.	Aqua bidest.
50	Gesamtmenge pro Reaktionsgefäß	Gesamtmenge pro Reaktionsgefäß

Tabelle 18: TLR4-PCR-Ansätze

Um eine mögliche Fremdkontamination der untersuchten Proben auszuschließen, wird zeitgleich mit den eigentlichen PCR-Ansätzen, auch eine Negativkontrolle angefertigt. Diese enthält – abgesehen von der durch 5 µl Aqua bidest. (Baker, Deventer/Holland) ersetzten DNA - exakt dieselben Reagenzien wie die DNA-Probenansätze, von denen unter Verwen-

ding eines Sammelansatzes mehrere gleichzeitig angesetzt werden können. Das PCR-Reaktionsgemisch wird in einen Thermocycler (MJResearch PTC225, Biozym, Hess, Oldendorf, Deutschland) gebracht und durch Auswahl des Programms bestimmten zyklischen Temperaturveränderungen ausgesetzt, wodurch der DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt wird. Zunächst wird dabei die doppelsträngige DNA bei einer Temperatur von 95 °C denaturiert, so dass DNA-Einzelstränge vorliegen. Die Primer lagern sich beim sogenannten annealing in einem von der Schmelztemperatur abhängigem Bereich - ungefähr zwischen 45 und 60 °C - an komplementäre einzelsträngige DNA an und werden bei 72 °C durch die thermostabile DNA-Polymerase am 3' OH-Ende des Primers verlängert. Diese drei Schritte werden gemäß der Einstellung der Zyklusanzahl im Cyclyer-Programm wiederholt. Bei der TLR4-PCR konnte für beide Polymorphismen ein Programm verwendet werden. Es handelt sich dabei um ein 40 Zyklen umfassendes Hotstart-Programm, mit jeweils 30" DNA-Denaturierung bei 94 °C, Primeranlagerung bei 60 °C und Primerverlängerung bei 72 °C.

2.2.3 PCR-Produktnachweis

Zur Überprüfung, ob ausreichend PCR-Produkt zur Weiterverarbeitung vorhanden ist, kann eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Überdies ist dabei die Beurteilung der zusätzlich mitangesetzten Negativkontrolle hinsichtlich einer potentiellen Fremdkontamination möglich. Die Elektrophorese stellt im Allgemeinen eine bedeutende Trennmethode dar, die sich das je nach Ladungszustand divergierende Molekülwanderungsverhalten im elektrischen Feld zu Nutze macht. Durch die Verwendung eines Gels als Trägermaterial werden die Teilchen zusätzlich noch nach ihrer Größe und ihrem Aufbau im Sinne eines Siebeffektes aufgetrennt. Zusätzlich spielen die elektrische Feldstärke und die Pufferlösung eine Rolle.⁵³ Eine graphische Veranschaulichung bietet die nachfolgende Abbildung.

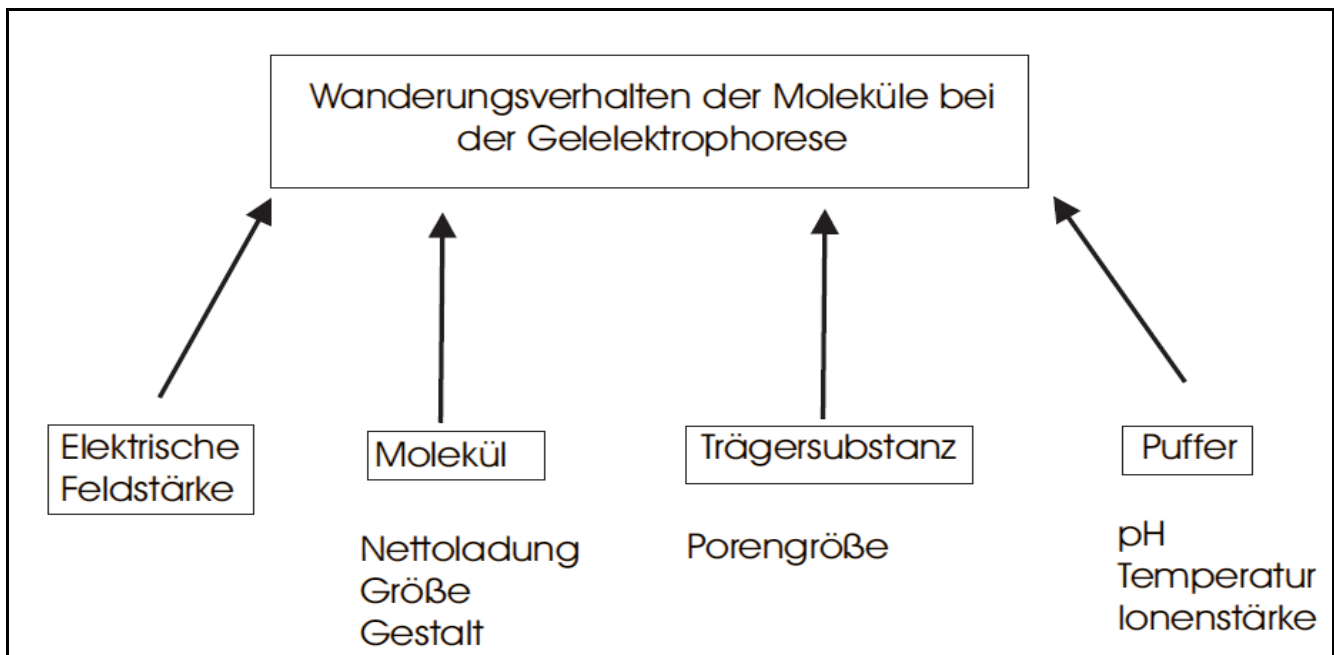


Abbildung 8: Beeinflussung der Molekülfortbewegung in der Gelelektrophorese (erstellt nach Dechert)
53

Zur Durchführung der Elektrophorese wird ein 1,5 %iges Agarose-Gel (Invitrogen, Karlsruhe) mit 6 µl Standard (DNA Molecular Weight Marker von Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot) und jeweils 10 µl der DNA-Proben bzw. der Negativkontrolle, mit je 1-2 µl Ficoll-Auftragepuffer (Sigma/Aldrich, Taufkirchen)ⁱⁱⁱ versehen, beschickt. Die so präparierte Agarose wird auf einem Gelträger (Invitrogen, Karlsruhe) in eine mit Marathon-Puffer^{iv} gefüllte Elektrophoresekammer (Invitrogen, Karlsruhe) gelegt. Mittels Spannungsgeräten (Amersham Biosciences, Freiburg) wird die Elektrophorese in Gang gesetzt. Um die sich im elektrischen Feld bewegend Banden sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid (Sigma/Aldrich, Taufkirchen) eingesetzt. Es handelt sich dabei um einen stark mutagenen Fluoreszenzfarbstoff, der zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkaliert und somit die Banden unter UV-Anregung zum Leuchten bringt.⁵³ Nach einer Einwirkzeit von einigen Minuten - je nach Frische der verwendeten Ethidiumbromidlösung - wird der Elektrophoresevorgang zur Auswaschung des überschüssigen Farbstoffs für einige Minuten fortgesetzt. Im Anschluss daran wird das Gel

ⁱⁱⁱ Ficoll-Auftragepuffer: 15 % Ficoll, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol

^{iv} 10 x (Marathon) TBE-Puffer: 1,35 M Tris (Invitrogen, Karlsruhe), 0,45 M Borsäure (Roth, Karlsruhe), 25 mM EDTA (Sigma/Aldrich, Taufkirchen)

zur Auswertung unter eine entsprechende Photoeinheit^v gelegt, wodurch bestimmte Bandenmuster sichtbar werden. Beim einfachen Produktnachweis sollte eine singuläre Bande zu sehen sein. Bei der Negativkontrolle sollte keine Fluoreszenz nachweisbar sein. Nur im Falle einer Kontamination des PCR-Ansatzes mit Fremdmaterial existiert ein unter UV-Licht nachweisbares Produkt. Abbildung 9 skizziert die möglichen Bandenmuster.

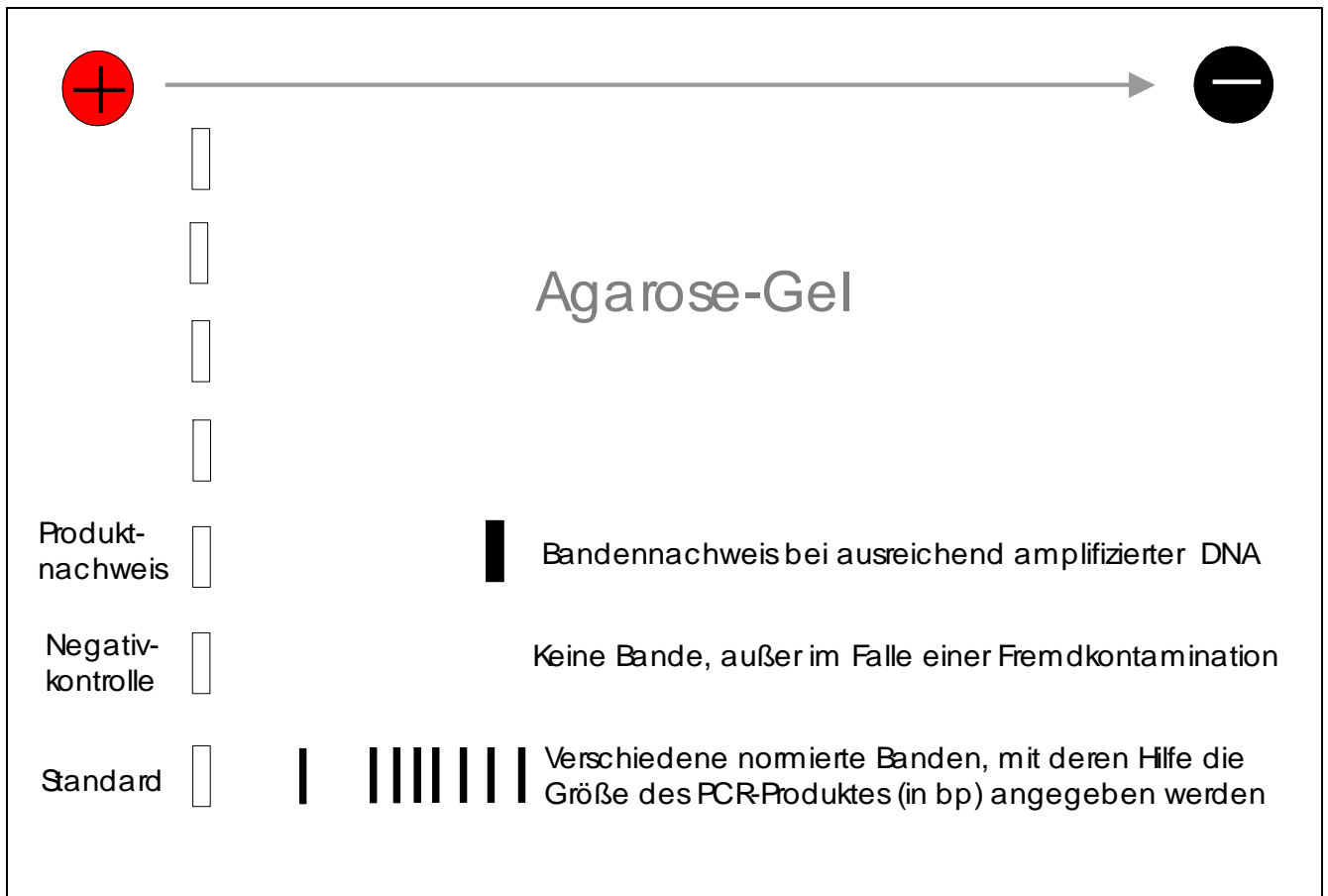


Abbildung 9: Skizze eines Agarose-Gels

Zur Dokumentation kann das Bandenmuster des Gels ausgedruckt oder als Bilddatei abgespeichert werden.

^v Aufbau der Photoeinheit: Bedienelement (MWG-Biotech, Ebersberg), Objektiv inklusive Halterung (Kaiser), 302nm UV-Lichtaufsatz (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen), Drucker Video Copy Processor (Mitsubishi)

2.3 DNA-Präzipitation mit Ethanol

Zur Konzentrierung der DNA für den nachfolgenden TLR4 -Restriktionsendonukleasenverdau erfolgt eine Fällung mit 125 µl 100 %igem Eisethanol (Merck, Darmstadt) und 2,5 µl 4 molarem Natriumchlorid (Merck, Darmstadt). Die Probenansätze werden im Anschluss für mindestens 20 Minuten bei –80 °C gefroren (Hera Freeze, Heraeus, Hanau) und im nächsten Schritt für 30 Minuten bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Der Probenüberstand wird abgekippt und die Reaktionsgefäße mit der zum Boden zentrifugierten DNA zum Trocknen aufgestellt. Die so vorbereitete DNA kann nun direkt in den getrockneten Reaktionsgefäßen für den jeweiligen Restriktionsendonukleasenverdau verwendet werden.

2.4 Nachweis der Polymorphismen mittels Restriktionsendonukleasenverdau

2.4.1 Restriktionsendonukleasenverdau

In den vorangegangenen Schritten wurde die DNA isoliert, amplifiziert und konzentriert. Die eigentliche Detektion der DNA-Polymorphismen ist noch nicht erfolgt. Im Folgenden soll nun der Nachweis der Allel-Varianten mittels Restriktionsendonukleasenverdau näher erläutert werden.

Restriktionsendonukleasen sind eigentlich Bestandteile der bakteriellen Virusabwehr, für deren Entdeckung und Anwendung in der Molekulargenetik W. Arber, D. Nathans und H. O. Smith 1978 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten.¹³³ Es handelt sich dabei um Enzyme, die doppelsträngige DNA sequenzspezifisch erkennen und schneiden, weshalb sie sich zur Detektion bestimmter DNA-Basenfolgen eignen.

Bei den TLR4-Polymorphismen handelt es sich um Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP), die die Erkennungssequenz für Restriktionsenzyme neu generieren. Demzufolge besteht zugleich mit dem Vorhandensein der veränderten Allelsequenz eine Schnittstelle für die entsprechende Restriktionsendonuklease, die ansonsten fehlt.¹³⁸ Der Nachweis der beiden TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile erfolgt anhand der Enzyme Nco I (New England BioLabs, Frankfurt) und HinfI (New England BioLabs, Frankfurt) unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Puffer NEB4^{vi} bzw. NEB2^{vii}.

^{vi} 1 X NEBuffer 4: 20 mM Tris-Acetat, 50 mM Kaliumacetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 bei 25 °C

^{vii} 1 X NEBuffer 2: 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, pH 7.9 bei 25 °C

Poly-morphismus	Enzym	Schnittstelle	Quelle	Puffer	Aktivität [U/ml]	Inkubations-temperatur [°C]
TLR4 Asp299Gly	Nco I	5'...C [▽] CATGG...3' 3'...GGTAC _Δ C...5'	<i>E. coli</i> -Strang mit dem geklonten Nco I Gen von <i>Nocardia corallina</i> (ATCC 19070)	NEB 4	10 000	37
TLR4 Thr399Ile	Hinf I	5'...G [▽] ANTC...3' 3'...CTNA _Δ G...5'	<i>E. coli</i> -Strang mit dem geklonten Hinf I Gen von <i>Hämophilus influenzae Rf</i> (ATCC 49824)	NEB 2	10 000	37

Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme

Die Versuchsprotokolle für die zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasenverdaus sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Asp299Gly	Thr399Ile
Zum DNA-Pellet im Reaktionsgefäß werden folgende Reagenzien hinzugefügt:	
1 µl NEB4	1 µl NEB2
1 µl NcoI	1 µl HinfI
8 µl Aqua bidest.	8 µl Aqua bidest.

Tabelle 20: Versuchsprotokoll pro Ansatz zum Nachweis der Polymorphismen

Zusätzlich wird zur Sicherung der Funktion des Ansatzes eine Positivkontrolle pipettiert. Es handelt sich dabei um eine DNA, die bekanntermaßen eine Schnittstelle besitzt und zeitgleich mit den zu untersuchenden Proben den bisherigen Versuchsablauf durchlaufen hat. Es werden dieselben Reagenzien in der gleichen Menge verwendet.

Um optimale Voraussetzungen für die Enzymaktivität zu schaffen, erfolgt eine Inkubation bei 37 °C in einem Wärmeschrank (Heraeus Typ B5028, Han au) für mindestens 4 h.

2.4.2 Low Melting Point (LMP)-Elektrophorese

Zur eigentlichen Auswertung des Verdaus kommt eine Gelelektrophorese mit einer 2 %igen low melting point Agarose (Helena Biosciences, Heidelberg) zur Anwendung. Das weitere Procedere mit den DNA-Proben aus den Restriktionsendonukleasenverdaus entspricht der Elektrophorese-Beschreibung beim Produktnachweis (2.2.3). Es werden jedoch andere Bandenmuster bei der Auswertung in der UV-Photoeinheit erwartet. Wie die nachfolgende Tabelle 21 zeigt, wird ein Muster aus drei Banden erwartet.

Polymorphismus			Bandenmuster	Bande in Abb.10
TLR4 Asp299Gly	Asp / Asp	AA homozygot	1 Bande à 188 bp	2
	Asp / Gly	AG heterozygot	3 Banden à 188, 168, 20 bp	3
	Gly / Gly	GG homozygot	2 Banden à 168 und 20 bp	*
TLR4 Thr399Ile	Thr / Thr	CC homozygot	1 Bande à 124 bp	5
	Thr / Ile	CT heterozygot	3 Banden à 124, 98 und 26 bp	6
	Ile / Ile	TT homozygot	2 Banden à 98 und 26 bp	*

Tabelle 21: Erwartete Bandenmuster

Die kleinste Bande mit 20 bp bzw. 26 bp entgeht auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit sehr leicht dem Nachweis, weswegen die beiden größeren Banden mit großer Sorgfalt ausgewertet werden müssen.

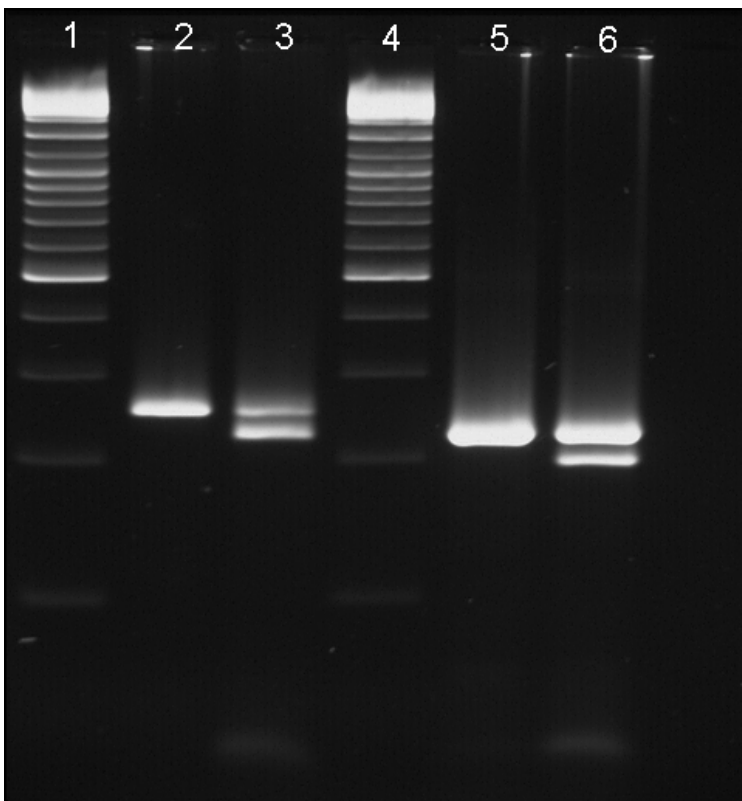


Abbildung 10: Bandenmuster nach Restriktionsendonukleasenverdau mit NcoI und HinfI. Bande 1 – Standard, 2 – Asp / Asp, 3 – Asp / Gly; 4 – Standard, 5 – Thr / Thr, 6 – Thr / Ile , * Keine Bande für Gly / Gly oder Ile / Ile, da im Kollektiv keine Individuen mit diesem Genotyp waren. Weitere Details Tabelle 21.

2.5 Analyse der NOD2-Mutationen

Die Genotyp-Daten der drei NOD2-Hauptmutationen Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC für meine Crohn-Studienpopulation wurden mir von Fabian Schnitzler, einem Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe, zur weitergehenden statistischen Auswertung der TLR4-Polymorphismen dankenswerterweise zur Verfügung gestellt. Die NOD2-Genotypisierung erfolgte mittels Sequenzierung (für Details siehe Referenz).²⁹

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Studiendaten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie und Epidemiologie der Universität München.

Im Vorfeld der Studie wurde eine Berechnung der benötigten Probandenzahl mit der Software „PS: Power and Sample Size Calculation“ durchgeführt (<http://biostat.mc.vanderbilt.edu/twiki/bin/view/Main/PowerSampleSize>). Diese Analyse zeigte, dass ein Kollektivumfang von jeweils mindestens 200 Crohn-Patienten und Kontrollpersonen die 80%ige Detektion eines Anstiegs des relativen Morbus Crohn-Risikos auf das mindestens 2,3 fache mit einem zweiseitigem $\alpha = 0,05$ (i.e. Typ I Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%) ermöglichen würde.

Zum Vergleich zwischen den kategorialen Variablen wurde der Fisher-Exakt-Test eingesetzt; für die Kontinuierlichen der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test). Sämtliche angewendete Tests waren zweiseitig. P-Werte $<0,05$ wurden als statistisch signifikant erachtet. Die logistische Regressionsanalyse wurde mittels der Computersoftware SAS 8.2 für Windows durchgeführt.

Zur Berechnung der Allel- und Genotypfrequenz in der Studienpopulation wurden Formeln des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes angewandt. Es handelt sich dabei um einen Begriff aus der Populationsgenetik, der auf dem theoretischem Konstrukt einer idealen Population basiert, in der die relative Häufigkeit von Gen-Allelen über Generationen konstant bleibt. Es bedarf für die Gültigkeit dieses Gleichgewichts einiger Grundvoraussetzungen, die in einer natürlichen Population nicht gegeben sind. Dennoch erweisen sich die Berechnungen zur groben Abschätzung der Genotypproportionen in der Praxis als nützlich. Unter der Annahme einer konstanten Gesamtfrequenz erhalten wir mit p als Frequenz des Allels A und q als Frequenz des Allels a die mathematische Formel $p + q = 1$, die aufgrund des diploiden humanen Genoms quadriert werden muss. Die mathematische Umsetzung sieht nun folgendermaßen aus: $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$, wobei p^2 der Frequenz des homozygoten Genotyps AA, $2pq$ des heterozygoten Genotyps Aa und q^2 des homozygoten Genotyps aa entspricht. So lässt sich anhand der Formel das erwartete Vorkommen z.B. heterozygoter Individuen abschätzen.²⁶⁵ Nicht-zufällige Abweichungen der Häufigkeiten bzw. eine Kosegregation zweier Allele werden als Kopplungsungleichgewicht bezeichnet. Als statistisches Verfahren zur Abschätzung der Zufälligkeit des gleichzeitigen Vorkommens der Polymorphismen kam die Standard Maximum likelihood-Methode zum Einsatz.²⁰

3. Resultate

3.1 Häufigkeit der TLR4-Polymorphismen in den Kollektiven

Die Resultate der Genotyp-Analyse von 204 Patienten mit Morbus Crohn und 199 Kontrollpersonen hinsichtlich der TLR4-Asp299Gly- und -Thr399Ile-Polymorphismen sind in der nachfolgenden Tabelle 22 dargestellt.

Häufigkeitsverteilung der TLR4-Genotypen				
Polymorphismen	Morbus Crohn (n = 204)	Kontrollen (n = 199)	P	OR (95% CI)
Asp299Gly				
Wildtyp (n = 359)	175 (85,8%)	184 (92,5%)	0,038	2,03 (1,05 – 3,92)
Heterozygote (n = 44)	29 (14,2%)	15 (7,5%)		
Homozygote (n = 0)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		
Thr399Ile				
Wildtyp (n = 354)	174 (85,3%)	180 (90,4%)	0,128	1,63 (0,88 – 3,01)
Heterozygote (n = 49)	30 (14,7%)	19 (9,6%)		
Homozygote (n = 0)	0 (0,0%)	0 (0,0%)		

Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der TLR4-Genotypen

Im Kollektiv der Morbus Crohn-Patienten resultierte somit eine signifikant höhere Frequenz der TLR4 Asp299Gly Heterozygoten als in der Kontrollgruppe (14,2% versus 7,5%; $P = 0,038$; odds ratio [OR] = 2,03). Die entsprechenden korrespondierenden Allelfrequenzen nach der Hardy-Weinberg-Formel betragen 7,1% und 3,9% ($P = 0,043$; OR = 1,95).

Im Gegensatz dazu wurde bezüglich der Häufigkeitsverteilung für die TLR4 Thr399Ile Heterozygoten keine signifikante Differenz zwischen den beiden Kollektiven beobachtet ($P = 0,13$). 14,7% der Patienten mit Morbus Crohn versus 9,6% der Kontrollen weisen den Thr399Ile-Polymorphismus auf, dessen Allelfrequenz im Crohn-Kollektiv 7,9% und im Referenzkollektiv 5,0% nach populationsgenetischen Berechnungen beträgt. In der gesamten untersuchten Studienpopulation konnten auf Grund der niedrigen Frequenz keine homozygoten Träger der zwei Aminosäure-Substitutionen gefunden werden. Basierend auf dem Hardy-Weinberg-Gesetz und der beobachteten Häufigkeit der Heterozygoten, liegen die erwarteten Häufigkeiten für Homozygote der beiden untersuchten TLR4-Polymorphismen bei jeweils 0,6% im Crohn-Kollektiv und 0,2% für Asp299Gly sowie 0,3% für Thr399Ile in der Kontrollgruppe.

Beim Vergleich der beiden TLR4-Polymorphismusträger-Gruppen fällt eine sehr hoher Überschneidungsgrad zwischen den Asp299Gly- und Thr399Ile-Heterozygoten auf, d.h. es liegen in einem Großteil der Fälle beide Aminosäuresubstitutionen gleichzeitig vor. Im Gesamtkollektiv mit 403 untersuchten Individuen konnten 50 für einen der beiden Polymorphismen Heterozygote ermittelt werden, wovon 86,0% ($n = 43$) eine Kosegregation

von Asp299Gly und Thr399Ile aufweisen. Lediglich bei sieben Personen (14%), liegt nur eine der TLR4-Varianten isoliert vor. Der Genotyp Asp299Gly+/Thr399Ile- ist im Gesamtkollektiv nur einmal vorhanden. Es handelt sich dabei um einen Patienten aus dem Crohn-Kollektiv. Die umgekehrte Variante, Asp299Gly-/Thr399+, findet sich bei sechs getesteten Individuen, wovon allerdings vier - und damit der größere Teil - aus der Kontrollgruppe stammen. Die exakten Resultate bezüglich der TLR4-Polymorphismen-Kosegregation können Tabelle 23 entnommen werden.

Kosegregation Asp299Gly und Thr399Ile				
Genotyp (n = 403)	Morbus Crohn (n = 204)	Kontrollen (n = 199)	P	OR (95%CI)
Wildtyp (n = 353)	173 (84,8%)	180 (90,4%)	0,097	1,69 (0,92-3,11)
Alle Heterozygoten (n = 50)	31 (15,2%)	19 (9,6%)		
Asp299Gly+/Thr399Ile+ (n = 43)	28 (13,7%)	15 (7,5%)	0,053	1,94 (1,00-3,76)
Asp299Gly+/Thr399Ile- (n = 1)	1 (0,5%)	0 (0%)	1,000	N/A
Asp299Gly-/Thr399Ile+ (n = 6)	2 (1,0%)	4 (2,0%)	0,444	0,52 (0,09-2,88)

Tabelle 23: Kosegregation der beiden TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile

Infolgedessen liegt der Verdacht auf ein Kopplungsungleichgewicht zwischen den Asp299Gly und Thr399Ile dringend nahe. Die diesbezüglich durchgeführte Analyse mittels Standard-Maximum-Likelihood-Methode²⁰ zeigt mit einem relativen δ -Koeffizienten von 0,96 ein hochgradiges Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden untersuchten TLR4-Polymorphismen auf. Demzufolge liegt eine hohe Kosegregationsrate der Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile vor.

3.2 Analyse der Phänotyp-Verteilung im Kollektiv

Die vom Genotyp unabhängige Auswertung der gesamten Crohn-Studienpopulation (n =294) gemäß der Vienna-Klassifikation, teilt die Patienten in 24 standardisierte Subgruppen auf. Die genauen Frequenzen der einzelnen Phänotypgruppen schlüsselt die nachfolgende Tabelle 24 auf.

Die Phänotypverteilung auf die 24 Subgruppen der Vienna-Klassifikation							
	A1: Erstdiagnosealter < 40J. (n = 176)			A2: Erstdiagnosealter > 40J. (n = 28)			Gesamt
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	
L1	5 (2,5%)	7 (3,4%)	20 (9,8%)	1 (0,5%)	2 (1,0%)	6 (2,9%)	41 (20,1%)
L2	6 (2,9%)	2 (1,0%)	19 (9,3%)	3 (1,5%)	0 (0%)	4 (2,0%)	34 (16,7%)
L3	14 (6,9%)	15 (7,4%)	57 (27,9%)	3 (1,5%)	3 (1,5%)	4 (2,0%)	96 (47,1%)
L4	4 (2,0%)	11 (5,4%)	16 (7,8%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1,0%)	33 (16,2%)
Gesamt	29 (14,2%)	35 (17,2%)	112 (54,9%)	7 (3,4%)	5 (2,4%)	16 (7,8%)	204 (100%)
A1 und A2				36 (17,6%)	40 (19,6%)	128 (62,7%)	204 (100%)

Tabelle 24: Phänotyphäufigkeiten der Crohn-Studienpopulation entsprechend den 24 Subgruppen der Vienna-Klassifikation. Bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv (n=204)

Die Mehrheit der untersuchten Patienten weist demzufolge gemäß dieser Klassifikation einen schweren Krankheitsphänotyp mit frühzeitigem Erkrankungsbeginn (Durchschnittsalter bei Erstdiagnose $27,6 \pm 11,4$ Jahre; 86,3% A1 versus 13,7% A2) auf. Im Detail bedeutet dies eine Zusammensetzung des Patientenkollektivs aus zu 62,7% mit penetrierenden (B3) und 19,6% strikturierenden (B2) gegenüber 17,6% ausschließlich inflammatorischen (B1) Krankheitsverläufen. Hinsichtlich der Lokalisation kommt mit 47,1% der Befall des terminalen Ileums mit zusätzlicher Kolonmanifestation (L3) am häufigsten vor. Abbildung 11 bietet eine graphische Veranschaulichung der dargelegten Resultate.

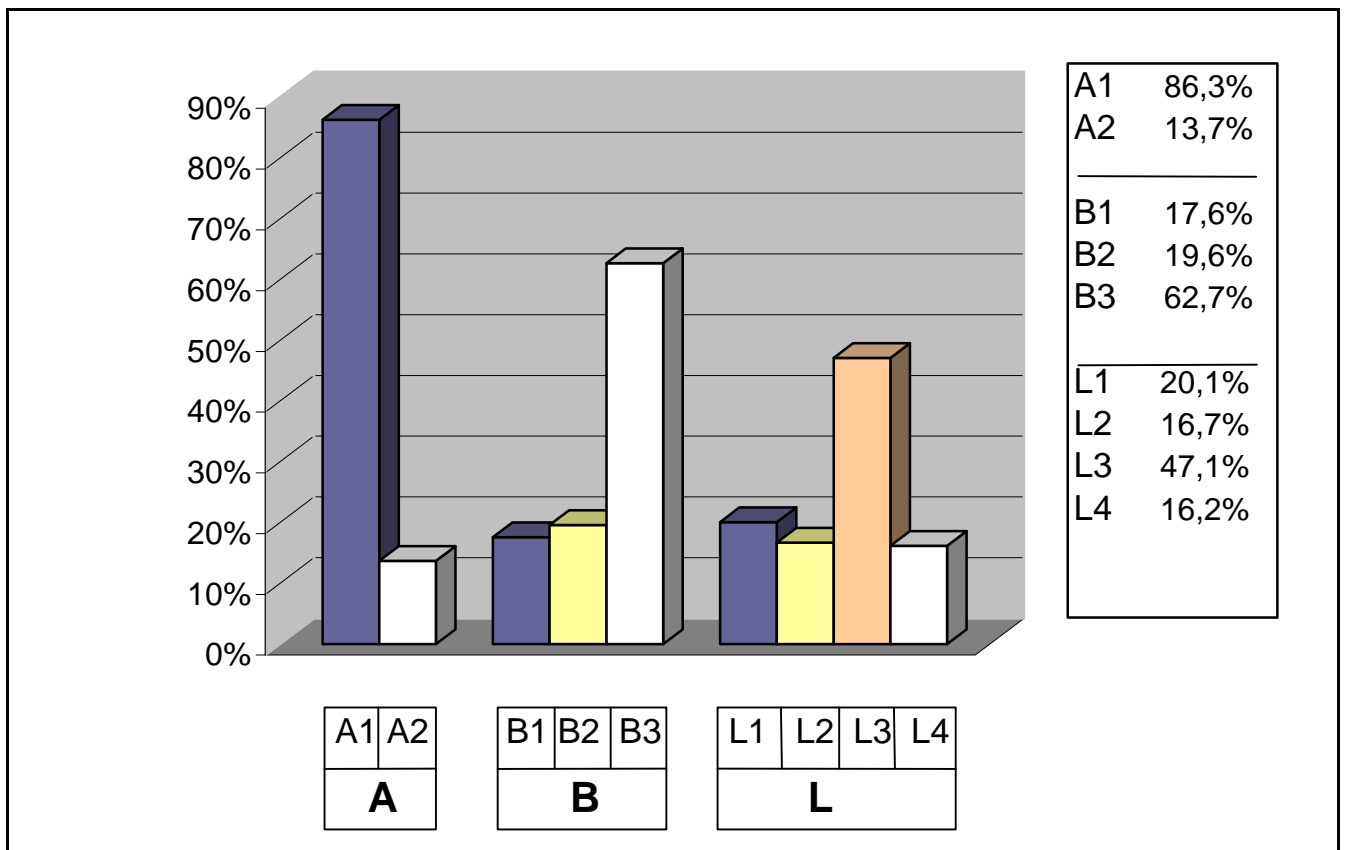


Abbildung 11: Verteilung der Phänotypen in der untersuchten Crohn-Studienpopulation

Innerhalb der Erstdiagnosegruppen A1 und A2 variieren die prozentualen Anteile der Verlaufsformen B leicht. Das Vorkommen von komplikationsbehafteten Krankengeschichten (B2, B3) ist bei Patienten mit Erstdiagnose vor dem 40. Lebensjahr im Vergleich zur Gruppe mit späterer Diagnosestellung vermehrt; wohingegen mehr rein-entzündliche Verläufe in A2 festzustellen sind (Tabelle 25, Abbildung 12a). Die Unterschiede im Krankheitsverlauf erreichen jedoch das Signifikanzniveau in der Gruppenaufschlüsselung nach dem Erstdiagnosealter nicht (B1 vs. B2+B3 $p=0,29$; B2 vs. B1+B3 $p= 1,00$; B3 vs. B1+B2 $p= 0,5327$). Die Unterschiede zwischen diesen beiden Subgruppen sind hinsichtlich des Lokalisationsmusters deutlicher ausgeprägt. Sowohl in A1 als auch in A2 stellt die Subgruppe L3 jeweils das Maximum dar, welches jedoch bei Erstdiagnose vor dem 40. Lebensjahr deutlicher ausgeprägt ist (48,9% A1 versus 35,7% A2). Bei späterer Erkrankung ist der isolierte Befall des terminalen Ileums (L1) nahezu genauso häufig, wie die dortige Manifestation mit zusätzlicher Kolonbeteiligung (32,1% versus 35,7% in A2). Der obere Intestinaltrakt ist in A2 mit 7,1% selten involviert, wohingegen in A1 immerhin bei 17,6% der obere Gastrointestinaltrakt involviert ist und der alleinige Kolonbefall (L2) am wenigsten vorkommt (15,3%). Wie Abbildung 12b graphisch veranschaulicht, ist - bezüglich der Lokalisation in A1 - L3 im Vergleich zu den anderen Lokalisationsformen wesentlich stärker betont, wohingegen bei Erstdiagnose nach dem 40. Lebensjahr die Gruppen L1, L3 und auch

L2 weniger divergieren. Signifikante Differenzen der Gruppen A1 und A2 finden sich jedoch auch bei der Analyse nach dem Befallsmuster L nicht (L1 vs. L2+L3+L4 $p=0,12$; L2 vs. L1+L3+L4 $p=0,27$; L3 vs. L1+L2+L4 $p=0,23$; L4 vs. L1+L2+L3 $p=0,27$).

Phänotypverteilungsunterschiede für Vienna A1 und A2								
	A1: Erstdiagnosealter < 40J. (n = 176)				A2: Erstdiagnosealter > 40J. (n = 28)			
	B1	B2	B3	Gesamt	B1	B2	B3	Gesamt
L1	5 (2,8%)	7 (4,0%)	20 (11,4%)	32 (18,2%)	1 (3,6%)	2 (7,1%)	6 (21,4%)	9 (32,1%)
L2	6 (3,4%)	2 (1,1%)	19 (10,8%)	27 (15,3%)	3 (10,7%)	0 (0%)	4 (14,3%)	7 (25,0%)
L3	14 (8,0%)	15 (8,5%)	57 (32,4%)	86 (48,9%)	3 (10,7%)	3 (10,7%)	4 (14,3%)	10 (35,7%)
L4	4 (2,3%)	11 (6,3%)	16 (9,1%)	31 (17,6%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (7,1%)	2 (7,1%)
Gesamt	29 (16,5%)	35 (19,9%)	112 (63,6%)	176 (100%)	7 (25,0%)	5 (17,9%)	16 (57,1%)	28 (100%)

Tabelle 25: Häufigkeit der Vienna-Subgruppen innerhalb der zwei Altersgruppen. Bezogen auf $n_{A1} = 176$ und $n_{A2} = 28$

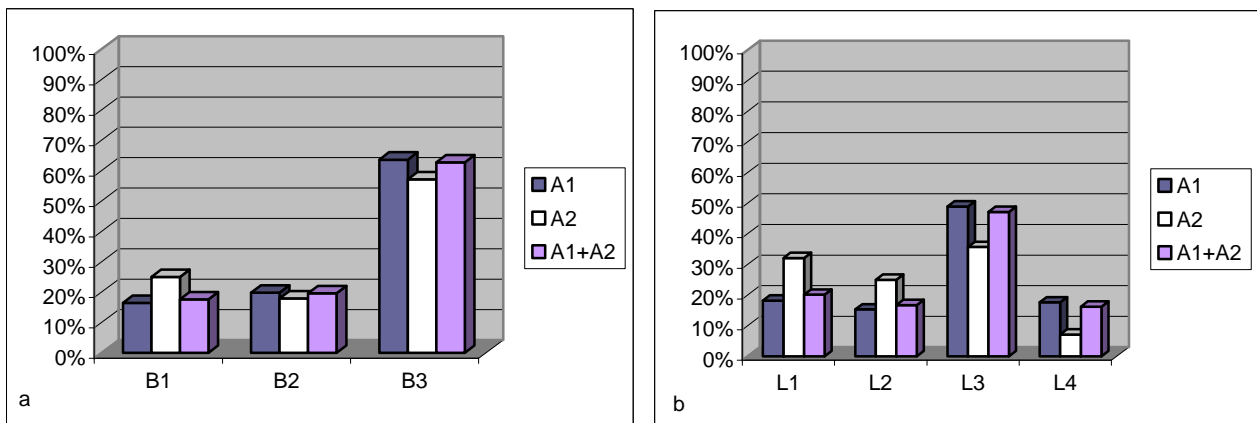


Abbildung 12: a) Unterschiede im Krankheitsverlauf b) im Lokalisationsmuster zwischen den Vienna-Erstdiagnosealtersgruppen A1 und A2

Unabhängig von der Vienna-Klassifikation lassen sich folgende Aussagen über das Vorhandensein von Komplikationen in der Großhaderner Crohn-Kohorte treffen: Der Anteil an Krankengeschichten mit Strikturen betrug 68,1% ($n = 139$). 53,9% der Patienten ($n = 110$) litten zum Zeitpunkt der Datenerhebung unter Fisteln. Bei 37,3% ($n = 76$) wurden im Krankheitsverlauf Abszesse diagnostiziert. In 57,8% der untersuchten Fälle war bei der Datenerhebung schon eine Morbus Crohn-bezogene Operation durchgeführt worden. 158 der 204 Patienten, das heißt 77,5%, hatten bereits eine immunsuppressive Therapie.

Die Analyse der Krankengeschichten bezüglich extraintestinaler Manifestationen und den nicht-krankheitsspezifischen Komplikationen sekundäre AA-Amyloidose, Psoriasis und

Osteoporose zeigte ein Vorkommen von 55,9% in der gesamten Kohorte. Das bedeutet im Detail, dass 114 von 204 Patienten eine oder mehrere der untersuchten begleitenden Beschwerden außerhalb des Gastrointestinaltraktes aufwiesen. Eine Gelenkbeteiligung konnte bei 84 Individuen - 41,2% in Relation zur gesamten Morbus Crohn-Kohorte gesetzt - festgestellt werden. Additiv fand sich bei insgesamt drei Patienten (1,5%) anamnestisch eine ankylosierende Spondylitis. Der Anteil an unter Osteoporose-Erkrankten machte einen Anteil von 18,6% (n=38) aus. Eine Beteiligung der Augen lag bei 16 Patienten vor (7,8%). Zusammengefasst hatten 14,7% begleitende Beschwerden im Bereich der Haut. Der größte Anteil der Crohn-Manifestation im Bereich des Integuments macht das Erythema nodosum mit 11,8% (24 Patienten) aus. Wesentlich seltener konnten eine Psoriasis (2,0%) oder ein Pyoderma gangraenosum (1,0%) in der Anamnese entdeckt werden. Eine primär sklerosierende Cholangitis trat lediglich bei einem Patienten auf (0,5%). Für das gesamte Kollektiv konnte kein Fall mit einer sekundären AA-Amyloidose dokumentiert werden.

3.3 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Die klinische Auswertung unter Einbeziehung der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile, deren exakte Ergebnisse in Tabelle 26 und Tabelle 27 aufgezeigt sind, liefert einige interessante Aspekte.

Assoziation zwischen dem TLR4-Asp299Gly-Polymorphismus und Morbus Crohn-Charakteristika				
Merkmale	TLR4 Wildtyp (n = 175)	Asp299Gly positiv (n = 29)	P	OR (95% CI) Asp299Gly-positiv versus Wildtyp
Männliches Geschlecht	84 (48,0%)	12 (41,4%)	0,552	0,76 (0,34 – 1,70)
Body mass index (kg/m ²)	23,3 ± 4,0	21,7 ± 3,0	0,059	N/A
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)				
Durchschnittsalter ± σ_x	27,8 ± 11,1	26,0 ± 13,4		
Streubreite	7 - 71	7 - 61	0,171	N/A
Krankheitsdauer (Jahre)	10,1 ± 8,0	10,7 ± 9,4	0,969	N/A
Alter (Jahre)				
<40 (A1)	152 (86,9%)	24 (82,8%)		
>40 (A2)	23 (13,1%)	5 (17,2%)	0,351	1,38 (0,48 – 3,97)
Lokalisation				
Terminales Ileum (L1)	35 (20,0%)	6 (20,7%)	1,000	1,04 (0,39 – 2,76)
Kolon (L2)	30 (17,1%)	4 (13,8%)	0,792	0,77 (0,25 – 2,38)
Ileokolon (L3)	83 (47,4%)	13 (44,8%)	0,843	0,90 (0,41 – 1,98)
Oberer Gastrointestinaltrakt (L4)	27 (15,4%)	6 (20,7%)	0,438	1,43 (0,53 – 3,84)
Krankheitsverlauf				
Nicht-strikurierend, nicht-penetrierend (B1)	31 (17,7%)	5 (17,2%)	1,000	0,97 (0,34 – 2,73)
Strikurierend (B2)	30 (17,1%)	10 (34,5%)	0,042	2,54 (1,08 – 6,02)
Penetrierend (B3)	114 (65,1%)	14 (48,3%)	0,098	0,50 (0,23 – 1,10)
Behandlung mit Immunsuppressiva	134 (76,6%)	24 (82,8%)	0,632	1,47 (0,53 – 4,09)
Operation wegen Morbus Crohn	103 (58,9%)	15 (51,7%)	0,544	0,75 (0,34 – 1,65)
Fisteln	98 (56,0%)	12 (41,4%)	0,163	0,55 (0,25 – 1,23)
Strikturen	116 (66,3%)	23 (79,3%)	0,200	1,95 (0,75 – 5,05)
Abszesse	66 (37,7%)	10 (34,5%)	0,837	0,87 (0,38 – 1,98)
Extraintestinale Manifestationen	96 (54,9%)	18 (62,1%)	0,547	1,35 (0,60 – 3,02)
Positive CED-Familienanamnese	21 (12,0%)	6 (20,7%)	0,234	1,91 (0,70 – 5,24)

Tabelle 26: Assoziation zwischen dem TLR4-Asp299Gly-Polymorphismus und Morbus Crohn-Charakteristika

Assoziation zwischen dem TLR4-Thr399Ile-Polymorphismus und Morbus Crohn-Charakteristika				
Merkmale	TLR4 Wildtyp (n = 174)	Thr399Ile positiv (n = 30)	P	OR (95% CI) Thr399Ile-positiv versus Wildtyp
Männliches Geschlecht	84 (48,3%)	12 (40,0%)	0,434	0,71 (0,32 – 1,57)
Body mass index (kg/m ²)	23,2 ± 4,1	21,9 ± 3,1	0,160	N/A
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)				
Durchschnittsalter ± σ_x	27,8 ± 11,0	26,1 ± 13,4		
Streubreite	7 - 71	7 - 61	0,145	N/A
Krankheitsdauer (Jahre)	10,2 ± 8,0	10,9 ± 9,2	0,803	N/A
Alter (Jahre)				
<40 (A1)	151 (86,8%)	25 (83,3%)		
>40 (A2)	23 (13,2%)	5 (16,7%)	0,573	1,31 (0,46 – 3,77)
Lokalisation				
Terminales Ileum (L1)	35 (20,1%)	6 (20,0%)	1,000	1,00 (0,38 – 2,63)
Kolon (L2)	29 (16,7%)	5 (16,7%)	1,000	1,00 (0,35 – 2,83)
Ileokolon (L3)	83 (47,7%)	13 (43,3%)	0,696	0,84 (0,38 – 1,83)
Oberer Gastrointestinaltrakt (L4)	27 (15,5%)	6 (20,0%)	0,591	1,36 (0,51 – 3,64)
Krankheitsverlauf				
Nicht-strikurierend, nicht-penetrierend (B1)	32 (18,4%)	4 (13,3%)	0,612	0,68 (0,22 – 2,09)
Strikturierend (B2)	29 (16,7%)	11 (36,7%)	0,022	2,89 (1,25 – 6,72)
Penetrierend (B3)	113 (64,9%)	15 (50,0%)	0,152	0,54 (0,25 – 1,18)
Behandlung mit Immunsuppressiva	132 (75,8%)	26 (86,7%)	0,241	2,07 (0,68 – 6,27)
Operation wegen Morbus Crohn	102 (58,6%)	16 (53,3%)	0,690	0,81 (0,37 – 1,76)
Fisteln	97 (55,7%)	13 (43,3%)	0,237	0,61 (0,28 – 1,33)
Strikturen	114 (65,5%)	25 (83,3%)	0,0582	2,63 (0,96 – 7,22)
Abszesse	65 (37,4%)	11 (36,7%)	1,000	0,97 (0,43 – 2,17)
Extraintestinale Manifestationen	95 (54,6%)	19 (63,3%)	0,429	1,44 (0,64 – 3,20)
Positive CED-Familienanamnese	21 (12,1%)	6 (20,0%)	0,246	1,82 (0,66 – 4,97)

Tabelle 27: Assoziation zwischen dem TLR4-Thr399Ile-Polymorphismus und Morbus Crohn-Charakteristika

So kann u.a. ein strikturierender Phänotyp (B2) bei 34,5% der heterozygoten Träger des TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus konstatiert werden, wohingegen das nur für 17,1% der Morbus Crohn-Patienten mit Wildtyp-Allelen zutrifft ($P = 0,04$). Ähnliches gilt für das Vorkommen dieses Phänotyps bei Thr399Ile-Allelträger. 36,7% der Patienten mit heterozygotem Phänotyp sind im Vergleich zu 16,7% der Wildtyp-Gruppe als strikturierend (B2) klassifiziert ($P = 0,02$). Zudem zeichnet sich ein Trend zu einer höheren Striktur-Inzidenz in der Thr399Ile-Subgruppe im Vergleich zu Patienten mit TLR4-Wildtyp ab (65,5%; $P = 0,058$). Für die Asp299Gly-Substitution kann zwar ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Strikturen in der Polymorphismus-Gruppe festgestellt werden, aber mit einer Differenz zwischen Wildtyp und Allelvariante von 13,0% wesentlich weniger ausgeprägt ($P = 0,20$). Die Krankheitsverläufe Vienna-Kategorie B1 und B3 zeigen im TLR4-Genotyp-abhängigen Vergleich keine entscheidenden Differenzen. Bei der Betrachtung des Body mass index - als relativ unsicherem Parameter für die Krankheitsschwere - fallen niedrigere Werte bei beiden

Polymorphismen im Verhältnis zu den Wildtypen auf, jedoch ohne Signifikanzen aufzuweisen.

Für einen Zusammenhang zwischen den untersuchten Polymorphismen und Abszessen bzw. Fisteln als weitere Morbus Crohn-typische Komplikationen besteht kein Anhalt. Die P-Werte belaufen sich dabei für Asp299Gly auf 0,837 und 0,163 in Bezug auf das Risiko einer Abszeß- und Fistelbildung; die P-Werte für Thr399Ile hinsichtlich Abszessen und Fisteln liegen bei 1,000 und 0,237. Hinsichtlich des Befallsmusters im Gastrointestinaltrakt und der Notwendigkeit der Immunsuppressiva-Applikation konnten ebensowenig relevante Unterschiede festgestellt werden. Ebenso ist der prozentuale Anteil der Patienten, die auf Grund des Morbus Crohn operiert werden mussten, mit 58,6% versus 53,3% relativ ausgewogen (P=0,69). Träger und Wildtypen zeigten ähnliche Häufigkeitsverhältnisse bei extraintestinalen Krankheitsmanifestationen und Begleiterkrankungen. Die TLR4-Genotyp-abhängigen Proportionen waren dabei in den isolierten Asp299Gly- bzw. Thr399Ile- und in der kombinierten TLR4-Analyse nahezu identisch. Tabellen 28 und 29 geben dazu eine Übersicht.

Extraintestinale Manifestationen und Begleiterkrankungen						
Merkmale	Asp299Gly Wildtyp (n = 175)	Asp299Gly positiv (n = 29)	P	Thr399Ile Wildtyp (n = 174)	Thr399Ile positiv (n = 30)	P
Gelenkbeteiligung	70 (40,0%)	14 (48,3%)	0,421	69 (39,7%)	15 (50,0%)	0,319
Ankylosierende Spondylitis	2 (1,1%)	1 (3,4%)	0,370	2 (1,1%)	1 (3,3%)	0,381
Osteoporose *	31 (17,7%)	7 (24,1%)	0,441	30 (17,2%)	8 (26,7%)	0,215
Augenbeteiligung	16 (9,1%)	0 (0,0%)	0,135	16 (9,2%)	0 (0,0%)	0,136
Erythema nodosum	21 (12,0%)	3 (10,3%)	1,000	21 (12,1%)	3 (10,0%)	1,000
Pyoderma gangraenosum	2 (1,1%)	0 (0,0%)	1,000	2 (1,1%)	0 (0,0%)	0,273
Psoriasis *	4 (2,3%)	0 (0,0%)	1,000	4 (2,3%)	0 (0,0%)	0,473
Sekundäre AA-Amyloidose *	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,000	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,000
Primär sklerosierende Cholangitis	1 (0,6%)	0 (0,0%)	1,000	1 (0,6%)	0 (0,0%)	0,147

Tabelle 28: Genotyp-abhängige Verteilung der Beschwerden außerhalb des Gastrointestinaltraktes in den isolierten Asp299Gly- bzw. Thr399Ile. (* nicht-krankheitsspezifische Komplikationen)

Extraintestinale Manifestationen und Begleiterkrankungen				
Merkmale	Asp299Gly - Thr399Ile - (n = 173)	Asp299Gly + Thr399Ile + (n =28)	Asp299Gly + Thr399Ile - (n = 1)	Asp299Gly - Thr399Ile + (n= 2)
Gelenkbeteiligung	69 (39,9%)	14 (50,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Ankylosierende Spondylitis	2 (1,2%)	1 (3,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Osteoporose *	30 (17,3%)	7 (25,0%)	0 (0,0%)	1 (50,0%)
Augenbeteiligung	16 (9,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Erythema nodosum	21 (12,1%)	3 (10,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Pyoderma gangraenosum	2 (1,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Psoriasis*	4 (2,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Sekundäre AA-Amyloidose *	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Primär sklerosierende Cholangitis	1 (0,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

Tabelle 29: Verteilung der Beschwerden außerhalb des Gastrointestinaltraktes in Abhängigkeit vom kombinierten TLR4-Genotyp. (* nicht-krankheitsspezifische Komplikationen)

Der Gelenkbeteiligungsanteil lag in den Wildtypgruppen bei rund 40%. In den TLR4-Varianten-Kohorten sind die Gelenke in nahezu der Hälfte der Fälle betroffen. Von den insgesamt drei an ankylosierender Spondylitis Betroffenen gehören zwei zur Wildtypgruppe. Der dritte Crohn-Patient ist TLR4-Compound-heterozygot. In der kombinierten Genotyp-Analyse weist von den insgesamt 38 Osteoporose-Fällen ein Patient isoliert die 399-Isoleucin-Variante (50,0% der entsprechenden Genotyp-Subgruppe) auf; sieben sind für beide TLR4-Polymorphismen heterozygot (25,0%) und die restlichen 30 zählen zur Wildtypentität (17,3%). Eine Augenbeteiligung fand sich lediglich bei Patienten mit normalen Allelen, wohingegen sich unter den Polymorphismusträgern keine Augenentzündungen eruieren ließen. 9,2% der Normvarianten-Trägern (16 Patienten) litten reziprok unter den erfragten entzündlichen Augenerkrankungen. Eine Beteiligung im Bereich der Haut lag in der kombinierten Analyse ausschließlich bei der reinen Wildtypgruppe und den Compound-Heterozygoten vor. Für die Asp299Gly- und Thr399Ile-positive Subgruppe ist die einzige Hautmanifestation das Erythema nodosum, welches bei drei Personen dieses Genotyps vorlag (10,7%). Die Mehrzahl von den schmerzhaften Flecken bzw. Knötchen Betroffenen (n = 21) weist die TLR4-Normvarianten auf. Im Umkehrschluss bedeutet dies einen Anteil von 12,1% in dieser genetischen Merkmalsgruppe. Von den 173 Patienten mit ausschließlich Wildtyp-Allelen haben 1,2% (n = 2) ein Pyoderma gangraenosum und 2,3% (n = 4) eine Psoriasis. Der einzige PSC-Fall ist bezüglich des TLR4-Status in die Wildtypgruppe einzuordnen.

Die drei Patienten, die genotypische Besonderheiten in Bezug auf die Asp299Gly- und Thr399Ile-Kosegregation aufweisen, werden durch folgende klinischen Merkmale charakterisiert: Die einzige Patientin mit isoliertem Asp299Gly-Polymorphismus, im Übrigen auch ohne

NOD2-Mutation, ist entsprechend der Vienna-Klassifikation als A1 B1 L1 einzugruppiert. Die Operations- und Familienanamnese ist negativ. Es liegen zum Zeitpunkt der Datenerhebung bei zweijähriger Krankheitsdauer keine extraintestinale Manifestationen vor. Die Patientin hat bis dahin noch keine Immunsuppressiva eingenommen. Auch bei den beiden Patienten mit isoliertem Thr399Ile-Allel handelt es sich um Frauen, mit den Subgruppen A1 B2 L1 und A1 B3 L2 der Vienna-Klassifikation. In der Anamnese findet sich bei beiden ein stattgehabtes thromboembolisches Geschehen. Immunsuppressiva sind ebenfalls bei beiden Patientinnen zum Einsatz gekommen. Die Familienanamnese ist in beiden Fällen unauffällig für chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Die als A1 B2 L1 klassifizierte Patientin hat, bei einer Krankheitsdauer von fünf Jahren, trotz der Striktur im Ileum noch keine Morbus Crohn-bezogene Operation gehabt. Bei einer 16-jährigen Erkrankungsdauer weist die als A1 B3 L2 eingestufte Frau als Komplikationen eine Kolon-Striktur, Fisteln und Abszesse auf und hat eine positive Operationsanamnese. Desweiteren konnten bei letzterer anamnestisch noch Arthritis und Osteoporose als Begleiterkrankungen eruiert werden. Der NOD2-Status war auch in diesen beiden Fällen unauffällig.

Für das untersuchte Kollektiv mit Morbus Crohn-Patienten standen Daten bezüglich des NOD2-Genotyps zur vergleichenden Auswertung zur Verfügung. Der Schwerpunkt lag dabei auf den drei häufigsten Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Mutationen Arg702Trp (R702W), Gly908Arg (G908R) sowie Leu3020insC.

Die Assoziation von NOD2 und TLR4					
Polymorphismen		Arg702Trp	Gly908Arg	Leu3020insC	Gesamtsumme der Patienten mit diesen NOD2-Allelvarianten
Asp299Gly	Wildtyp n = 175	27 (15,4%)	14 (8,0%)	36 (20,6%)	67* (38,3%)
	Heterozygot n = 29	7 (24,1%)	0 (0%)	3 (10,3%)	10 (34,5%)
Thr399Ile	Wildtyp n = 174	27 (15,5%)	14 (8,0%)	36 (20,7%)	67* (38,5%)
	Heterozygot n = 30	7 (24,1%)	0 (0%)	3 (10,0%)	10 (33,3%)
Kombination Asp299Gly Thr399Ile	Wildtyp n = 173	27 (15,6%)	14 (8,1%)	36 (20,8%)	67* (38,7%)
	Alle Heterozygoten n = 31	7 (22,6%)	0 (0%)	3 (9,7%)	10 (32,2%)
	Asp299Gly+/Thr399Ile+ n = 28	7 (25,0%)	0 (0%)	3 (10,7%)	10 (35,7%)
	Asp299Gly+/Thr399Ile- n = 1	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Asp299Gly-/Thr399Ile+ n = 2	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Tabelle 30: Die Verteilung der drei NOD2-Mutationen Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC in Bezug auf die TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile; * 10 Patienten mit TLR4-Wildtyp waren heterozygot für mehr als eine NOD2-Mutation, weshalb 67 anstatt 77 Patienten mindestens eine der drei NOD2-Hauptmutationen haben.

Die kombinierte Prävalenz für diese drei NOD2-Mutationen in der Morbus Crohn-Studienkohorte belief sich auf 37,7% (n = 77). Es bestand kein signifikanter Prävalenzunterschied zwischen den TLR4-Subgruppen. So konnte bei 38,7% der TLR4-Kombinationswildtyp-Gruppe im Vergleich zu 32,2% der für Asp299Gly- und / oder Thr399Ile-Heterozygoten eine der besagten NOD2-Genmutationen gefunden werden. Auch bei Betrachtung des Vorkommens für die einzelnen TLR4-Polymorphismen zeigen sich keine relevanten Differenzen. Zehn Individuen des Morbus Crohn-Kollektivs hatten einen Genotyp mit TLR4- und NOD2-Mutationen zugleich, davon wiesen sieben eine Arg702Trp Aminosäuresubstitution und drei die Leu3020insC Mutation auf. Bei keinem der Patienten mit TLR4-Polymorphismus-Heterozygotie (Asp299Gly oder Thr399Ile) wurde additiv eine Gly908Arg-Mutation gefunden. Jedoch war jeder einzelne Genotyp zu selten um eine statistische Analyse zu erlauben.

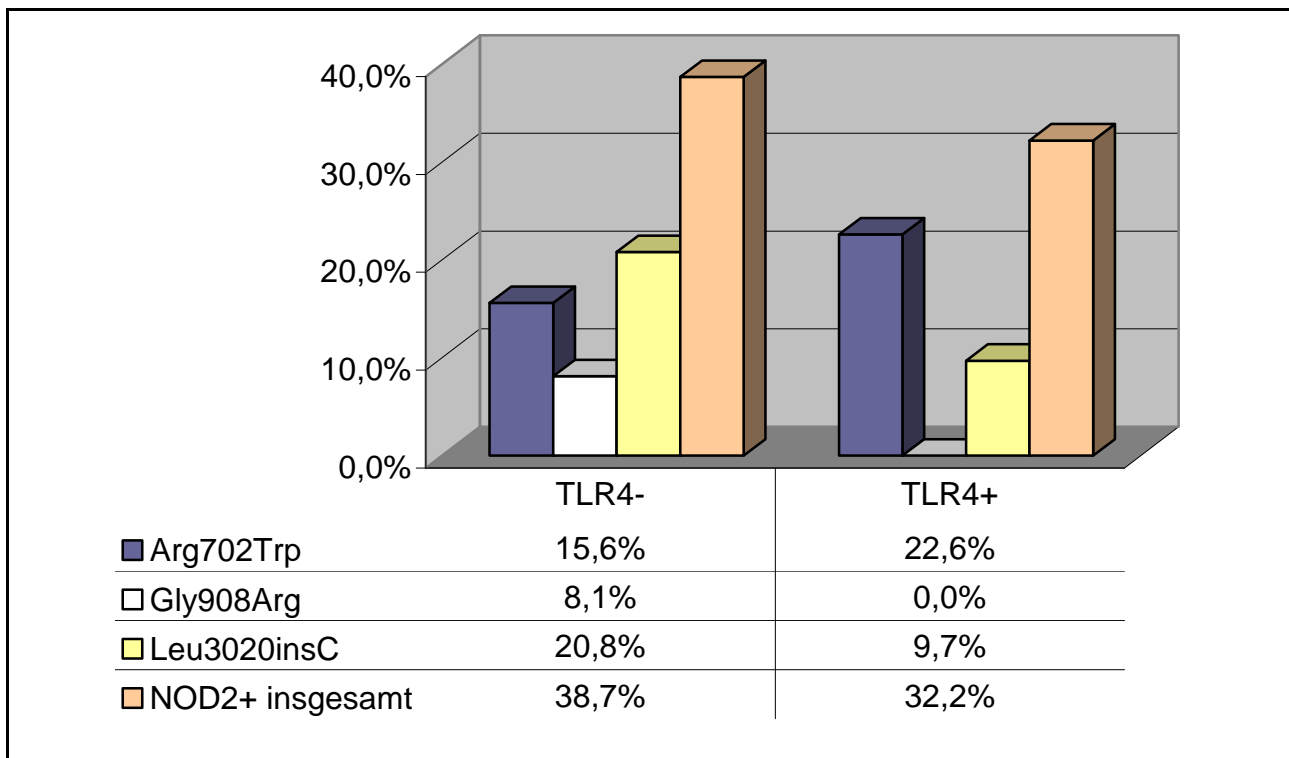


Abbildung 13: Prävalenz der drei häufigsten NOD2-Mutationen Arg702Trp, Gly908Arg, Leu3020insC in Abhängigkeit des TLR4-Polymorphismus-Status (reine TLR4-Wildtypen n = 173 und TLR4-Heterozygote n = 31)

Das vorhin erwähnte Kopplungsungleichgewicht, das sich im Übrigen ähnlich zu vorhergehenden Studien^{113, 227, 254} verhält, äußert sich mit dem Vorhandensein der Asp299Gly-Mutation bei 28 von 30 (93,3%) der heterozygoten Träger des Thr399Ile-Polymorphismus, was uns das Zusammenfassen dieser zehn Mischgenotypen und eine vereinfachende Einteilung des 204 Individuen umfassenden Patientenkollektivs in vier verschiedene Gruppen erlaubt. Zumal die bisherigen aufgesplitteten Analysen für die beiden TLR4-Polymorphismen kaum Unterschiede aufzeigen konnten, wird bei der TLR4-NOD2-Phänotyp-Untersuchung ohne gesonderte Berücksichtigung der drei Patienten ohne Kosegregation durchgeführt. Die Aufgliederung dieser Gruppen richtet sich daher, unter Verzicht auf eine zusätzliche Einbeziehung des Thr399Ile, nach der Existenz der Asp299Gly-Variation (TLR4+) und der Präsenz einer der drei Hauptmutationen des NOD2-Gens Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC (NOD2+). Demzufolge stehen die vier Subgruppen TLR4+/NOD2+, TLR4+/NOD2-, TLR4-/NOD2+ und TLR4-/NOD2- für die Genotyp-Phänotyp-Analyse zur Verfügung. Tabelle 31 schlüsselt die dabei entstehenden detaillierten Resultate auf.

Assoziationen zwischen TLR4 Asp299Gly Polymorphismus, NOD2-Mutation und Krankheitscharakteristika des Morbus Crohn				
Merkmale	(1) TLR4+/NOD2+ (n = 10)	(2) TLR4+/ NOD2- (n = 19)	(3) TLR4-/ NOD2+ (n = 67)	(4) TLR4-/ NOD2- (n = 108)
Männlich (%)	5 (50,0%)	7 (36,8%)	35 (52,2%)	49 (45,4%)
Body Mass Index (kg/m ²)	22,0 ± 2,7	21,5 ± 3,2	22,7 ± 3,4	23,6 ± 4,32
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)				
Durchschnittsalter ± σ_x	24,9 ± 17,2	26,6 ± 10,8	27,4 ± 10,7	28,1 ± 11,2
Streubreite	7 – 61	12 – 51	14 – 66	7 – 71
Krankheitsdauer (Jahre)	17,3 ± 11,3	7,2 ± 5,7	9,9 ± 8,3	10,3 ± 7,8
Alter (Jahre)				
<40 A1	8 (80,0%)	16 (84,2%)	58 (86,6%)	94 (87,0%)
>40 A2	2 (20,0%)	3 (15,8%)	9 (13,4%)	14 (13,0%)
Lokalisation				
Terminales Ileum (L1)	3 (30,0%)	3 (15,8%)	19 (28,4%)	16 (14,8%)
Kolon (L2)	1 (10,0%)	3 (15,8%)	9 (13,4%)	21 (19,4%)
Ileokolon (L3)	4 (40,0%)	9 (47,4%)	34 (50,7%)	49 (45,4%)
Oberer Gastrointestinaltrakt (L4)	2 (20,0%)	4 (21,1%)	5 (7,5%)	22 (20,4%)
			<i>P = 0,0339 versus (4)</i>	
			<i>P = 0,030 versus (4)</i>	
Krankheitsverlauf				
Nicht-strikurierend, nicht-penetrierend (B1)	4 (40,0%)	1 (5,3%), <i>P = 0,0357 versus (1)</i>	12 (17,9%)	19 (17,6%)
Strikturierend (B2)	1 (10,0%)	9 (47,4%), <i>P = 0,0009 versus (3)</i> <i>P = 0,0226 versus (4)</i>	7 (10,4%)	23 (21,3%)
Penetrierend (B3)	5 (50,0%)	9 (47,4%), <i>P = 0,0586 versus (3)</i>	48 (71,6%), <i>P = 0,0975 versus (4)</i>	66 (61,1%)
Behandlung mit Immunsuppressiva	6 (60,0%)	10 (52,6%)	45 (67,2%)	65 (60,2%)
Operation wegen Morbus Crohn	5 (50,0%)	10 (52,6%)	43 (64,2%)	60 (55,6%)
Fisteln	3 (30,0%)	9 (47,4%)	40 (59,7%)	58 (53,7%)
Strikturen	6 (60,0%)	17 (89,5%), <i>P = 0,0493 versus (3)</i> <i>P = 0,0571 versus (4)</i>	44 (65,7%)	72 (66,7%)
Abszesse	3 (30,0%)	7 (36,8%)	24 (35,8%)	42 (38,9%)
Positive CED-Familienanamnese	3 (30,0%), <i>P = 0,08 versus (4)</i>	3 (15,8%)	11 (16,4%)	10 (9,3%)
Extraintestinale Manifestationen	6 (60,0%)	12 (63,2%)	33 (49,3%)	63 (58,3%)

TLR4+, heterozygot für Asp299GlyPolymorphismus; NOD2+, positiv für mindestens eine der geläufigsten NOD2-Mutationen Arg702Trp, Gly908Arg oder Leu3020insC; σ_x , Standardabweichung
Wichtige Vergleiche zwischen den Gruppen sind mit *Kursivschrift* hervorgehoben.

Tabelle 31: Assoziation zwischen dem TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus, NOD2-Mutationen und Krankheitscharakteristika des Morbus Crohn

Bei Betrachtung der oben genannten Subgruppen zeigt sich eine Kopplung des TLR4+/NOD2- -Genotyps mit einem strikturierendem Krankheitsphänotyp; 47,4% dieser Patienten (TLR4+/NOD2-) entsprechen bei Anwendung der Vienna-Klassifikation einem strikturierendem Phänotyp B2. Der Anteil des Vienna-B2-Krankheitsverlaufs ist im Vergleich dazu bei den drei anderen Subgruppen wesentlich geringer. Im Detail bedeutet dies 10,0%

($P = 0,0976$) in der TLR4+/NOD2+ -, 10,4% ($P = 0,0009$) in der TLR4-/NOD2+ - sowie 21,3% in der Wildtyp (TLR4-/NOD2-)-Submenge ($P = 0,0226$).

Im Gegensatz dazu besteht ein Trend zu einer höheren Prävalenz des penetrierenden Phänotyps (nach Vienna-Klassifikation B3) in der TLR4-/NOD2+ -Untereinheit, 71,6% versus 47,4% in der TLR4+/NOD2- -Gruppe ($P = 0,0586$). Dieser Trend ist zu den TLR4+/NOD2+ - und TLR4-/NOD2- -Anteilen mit 50,0% ($P = 0,270$) und 61,1% ($P = 0,192$) weniger deutlich ausgeprägt.

Außerdem ließen sich bei 89,5% der TLR4+/NOD2- -Patienten eine intestinale Strikturen in der Krankengeschichte nachweisen, wohingegen diese nur bei 65,7% ($P = 0,0493$) der TLR4-/NOD2+ -Merkmalsträger diagnostiziert worden war. Das Strikturrisiko ist ebenso gegenüber den genetisch Unauffälligen erhöht und liegt nahe am Signifikanzniveau ($P = 0,0571$). Der prozentuale Anteil der TLR4+/NOD2+ und der reinen Wildtypen verhält sich in dieser Hinsicht mit 60,0% und 66,7% ähnlich zur TLR4-/NOD2+ -Gruppe ($P = 0,734$). Die Gegenüberstellung der Patienten mit mindestens einer der untersuchten Mutationen mit Morbus Crohn-Patienten mit unauffälliger Genetik ergibt keine relevanten Unterschiede ($P = 0,654$).

Nur ein einziger von 19 Patienten (5,3%) der TLR4+/NOD2- zeigte einen rein inflammatorischen Verlauf ohne Strikturenbildung und penetrierendem Krankheitsverlauf (B1 gemäß Vienna-Klassifikation). Der Vergleich mit den TLR4+/NOD2+ - Morbus Crohn-Patienten mit 40,0% B1-Anteil erreicht mit einem P-Wert von 0,0357 statistische Relevanz. Der Anteil der Krankheitsverläufe ohne Komplikationen (Vienna B1) betrug bei den TLR4-Negativen aber NOD2-Positiven immerhin noch 17,9%. Ein zu Letzterem sehr ähnliches Resultat war in Wildtyp-Subentität (17,6%) zu konstatieren. Der geringfügige B1-Anteil in der TLR4+/NOD2- Gruppe suggeriert demzufolge eine Prädisposition für die Entwicklung eines komplikationsreichen Krankheitsverlaufs - insbesondere durch Strikturenbildung.

Ähnliche Ergebnisse wurden für den zweiten untersuchten TLR4-Polymorphismus Thr399Ile erzielt. 50,0% der Patienten mit TLR399+/NOD2- Genotyp wurden als strikturierender Phänotyp klassifiziert, die wesentlich geringeren 10,4% in der TLR399-/NOD2+ -Gruppe gegenüberstehen ($P = 0,0004$). 95% der TLR399+/NOD2-Submenge wurde durch eine Strikturen in der Krankheitsgeschichte charakterisiert, wohingegen lediglich 65,7% mit TLR399-/NOD2+ -Genotyp eine intestinale Strikturen aufwiesen ($P = 0,0098$).

Die anderen typischen Morbus Crohn-Komplikationen, wie Fisteln und Abszesse, divergieren beim Vergleichen der vier Genotypen lediglich geringfügig auf statistisch irrelevantem Niveau. Ebenso bringen die TLR4/NOD2-Gruppen hinsichtlich Vienna-Kategorie A keine neuen Aspekte zum Vorschein. Bei genauerer Analyse der Befallslokalisation zeigen sich Differenzen zwischen dem Vorkommen der Vienna-Parameter L1 und L4. Der Befall des

Ileokolons sowie eine Beteiligung des oberen Gastrointestinaltraktes tritt häufiger bei isolierten NOD2-Mutationen auf als bei Genotypen ohne jegliche Mutation ($P = 0,0339$ und $0,030$ für L1 und L4). Bei der zusammenfassenden Gegenüberstellung der Variantensubgruppen gegen die reinen Wildtyp-Patienten sind die P-Werte für den Befall des Ileokolons und des oberen Verdauungstraktes mit $P = 0,0547$ bzw. $0,091$ relativ niedrig, aber nicht signifikant.

Mit zunehmender Krankheitsdauer steigt die Wahrscheinlichkeit für Morbus Crohn-Patienten mit bislang rein inflammatorischer Aktivität, einen schwereren Krankheitsphänotyp mit strikturierenden oder penetrierenden Komplikationen zu entwickeln.^{43, 143} Anhand einer logistischen Regressionsanalyse wurde der Einfluss der Krankheitsdauer auf den Krankheitsphänotyp untersucht. Hierzu wurden, unter Einbeziehung der Krankheitsdauer und des TLR4- und NOD2-Mutationsstatus als mögliche Prädiktoren, die strikturierenden B2- sowie die penetrierenden B3-Phänotypen verglichen. Der TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus zeigte einen Trend zur negativen Assoziation mit dem penetrierendem Krankheitsphänotyp (OR, $0,41$; 95%CI: $0,15-1,09$; $P = 0,07$). Ebenso bestand eine direkte Assoziation der NOD2-Mutationen (OR, $2,61$; 95% CI: $1,09-6,27$; $P = 0,03$) und der Krankheitsdauer (OR, $1,08$ pro Jahr; 95% CI: $1,02-1,14$; $P = 0,007$) mit einem penetrierendem Krankheitsphänotyp. Umgekehrt fiel ein Trend für eine positive Assoziation zwischen dem TLR4-Polymorphismus Asp299Gly und dem strikturierenden Phänotyp auf (OR, $2,46$; 95% CI: $0,92-6,60$), der allerdings keine statistische Signifikanz aufwies ($P = 0,07$).

Hinsichtlich der positiven Familienanamnese für chronisch entzündliche Darmerkrankungen fallen Trends bei der Gegenüberstellung der genetisch unterschiedlich schwer belasteten Gruppen auf. So steht ein Anteil von $30,0\%$ der genetisch am schwersten belasteten Gruppe geringen $9,3\%$ der TLR4-/NOD2- -Entität gegenüber ($P = 0,080$). Auch der Vergleich der genetisch unauffälligen Gruppe mit allen Patienten mit mindestens einer TLR4- oder NOD2-Mutation ergibt einen niedrigen P-Wert ($P = 0,0976$).

Eine detailliertere Aufschlüsselung der extraintestinalen Manifestationen in Abhängigkeit des TLR4/NOD2-Status liefert Tabelle 32. Beim Vergleich der einzelnen Begleiterscheinungen präsentiert sich ein einziger signifikanter Unterschied zwischen den vier Subgruppen TLR4+/NOD2+, TLR4+/NOD2-, TLR4-/NOD2+ und TLR4-/NOD2-. In der TLR4-/NOD2- -Gruppe tritt gegenüber den TLR4-/NOD2+ - Allelträgern deutlich häufiger eine Gelenkbeteiligung auf ($P=0,039$). Zudem fällt ein niedriger, aber nicht signifikanter P-Wert ($P = 0,073$) bei der Gegenüberstellung der Patienten mit unauffälligem Genotyp mit mindestens einer Variante bezüglich der begleitenden Augenentzündungen ((4) versus (1)+(2)+(3)) auf.

Darüberhinaus lassen sich keine weiteren erwähnenswerten Unterschiede in diesem Themenbereich feststellen.

Extraintestinale Manifestationen und Begleiterkrankungen				
Merkmale	(1) TLR4+/NOD2+ (n=10)	(2) TLR4+/ NOD2- (n = 19)	(3) TLR4-/ NOD2+ (n = 67)	(4) TLR4-/ NOD2- (n=108)
Gelenkbeteiligung (n = 84)	4 (40,0%)	10 (52,6%)	20 (29,9%) <i>P(2) versus (3) = 0,100</i>	50 (46,3%) <i>P (3) versus (4)= 0,039</i>
Ankylosierende Spondylitis (n = 3)	1 (10,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,9%)
Osteoporose (n = 38)	3 (30,0%)	4 (21,1%)	13 (19,4%)	18 (16,7%)
Augenbeteiligung (n = 16)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (6,0%)	12 (11,1%) <i>P (2) versus (4) = 0,211</i>
Erythema nodosum (n = 24)	0 (0,0%)	3 (15,8%)	5 (7,5%)	16 (14,8%)
Pyoderma gangraenosum (n = 2)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,9%)
Psoriasis (n = 4)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,5%)	3 (2,8%)
Sekundäre AA-Amyloidose (n = 0)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Primär sklerosierende Cholangitis (n = 1)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,9%)

Tabelle 32: Detaillierte TLR4/NOD2-Phänotyp-Aufschlüsselung der extraintestinalen Manifestationen und nicht-krankheitsspezifischen Komplikationen Osteoporose, Psoriasis und Amyloidose

4 Diskussion

4.1 Häufigkeit der TLR 4-Polymorphismen

Die deutliche Vernetzung der angeborenen Immunität mit der Genetik, die diversen Parallelen zum Morbus Crohn-Suszeptibilitätsgen NOD2, die von Cario und Podolsky bei CED-Patienten festgestellte TLR4-Hochregulation in intestinalen Epithelzellen³⁵ sowie die Assoziation dieses Rezeptors zu verschiedenen Erkrankungen mit immunologischem Hintergrund (Tabelle 33) legen allesamt eine Relevanz der untersuchten Toll-like-Rezeptor 4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile in der Ätiologie des Morbus Crohn nahe. Insbesondere die Vielzahl an Studien mit positiver Asp299Gly- und / oder Thr399Ile-Assoziation zu immunologischen bzw. infektiologischen Themenkomplexen bekräftigt die Hypothese einer Beteiligung an der Crohn-Pathogenese. Auch wenn nicht in allen Untersuchungen dieser besagten Themenkomplexe, wie z.T. bei der Multiplen Sklerose¹⁹², dem systemischen Lupus erythemathodes sowie der rheumatoiden Arthritis²⁰⁶, der Spondylarthropathie⁸² und der ankylosierenden Spondylitis^{2, 251}, ein Zusammenhang nachzuweisen war, so überwiegen dennoch die Berichte über eine Koppelung mit gramnegativen Infektionskrankungen, Asthma und Atopie, Sarkoidose und Transplantatreaktionen. Für die akute Graft-versus-host-disease konnte zudem auch ein Trend ohne statistische Signifikanz für ein vermindertes Erkrankungsrisiko bei gleichzeitig gesteigerter Anfälligkeit für gramnegative Bakteriämien ermittelt werden.¹⁴² Manche Untersuchungen legen nahe, dass der TLR4-Polymorphismus Asp299Gly größere Effekte als die Threonin-Isoleucin-Substitution bewirken könnte.^{13, 113, 141, 266} Lediglich die Malaria studie von Mockenhaupt et al.¹⁵⁰ ermittelte reziproke Verhältnisse.

Erkrankung (SNP)	Assoziation	Autor (Jahr)
	Infektiologie und Immunologie	
Endotoxinhyporesponsivität (Asp299Gly /Thr399Ile)	Assoziation mit Endotoxinhyporesponsivität	Arbour (2000) ¹³
Frühgeburtlichkeit (Asp299Gly /Thr399Ile)	Erhöhtes Frühgeburtsrisiko, begünstigt durch gramnegative Urogenitalinfektionen	Lorenz (2002) ¹³⁹
Gramnegative Sepsis (Asp299Gly /Thr399Ile)	Prädisposition für die Entwicklung einer Sepsis mit gramnegativen Mikroorganismen	Lorenz (2002) ¹⁴¹
Gramnegative Infektionen (Asp299Gly /Thr399Ile)	Erhöhte Inzidenz gramnegativer Infektionen bei Schwerkranken	Agnese (2002) ³
Vaginale Immunabwehr bei Schwangeren (Asp299Gly)	Interindividuelle Unterschiede in der vaginalen Immunreaktion gegen Gardnerella vaginalis / gramnegative Anaerobier	Genc (2004) ⁸¹
Malaria (Asp299Gly /Thr399Ile)	1,5 / 2,6 fach erhöhtes Erkrankungsrisiko für schwere Malaria	Mockenhaupt (2006) ¹⁵⁰
Osteomyelitis (Asp299Gly /Thr399Ile)	Prädisposition für gramnegative / hämatogene Osteomyelitis	Montes (2006) ¹⁵³
Candidämie (Asp299Gly /Thr399Ile)	Erhöhte Candidämie-Anfälligkeit mit einer erhöhten IL-10-Produktion für Asp299Gly und Thr399Ile.	Van der Graaf (2006) ²⁵⁰
Hyporesponsivität für Porphyromonas gingivalis (Asp299Gly)	Funktionelle Hyporesponsivität für das gramnegative Bakterium Porphyromonas gingivalis für heterozygote Gingivaepithelzellen.	Kinane (2006) ¹¹⁴
Lungentransplantat-abstoßung (Asp299Gly /Thr399Ile)	Reduzierte frühe Transplantatabstoßung durch Abschwächung der Endotoxinantwort bei den Transplantat empfangenden Polymorphismen-Trägern.	Palmer (2003) ¹⁷⁸
Nierentransplantat-abstoßung (Asp299Gly /Thr399Ile)	Reduzierte frühe Transplantatabstoßung bei Transplantaten von Polymorphismus-tragenden Spendern	Palmer (2006) ¹⁷⁹
Asthma (Asp299Gly /Thr399Ile)	Assoziation mit einer modifizierten Endotoxin-Antwort	Werner (2003) ²⁵⁸
Atopie bei Asthmatikern (Asp299Gly)	Assoziation mit einem höheren Atopie-Schweregrad	Yang (2004) ²⁶³
Sarkoidose (Asp299Gly /Thr399Ile)	Hochsignifikante Assoziation mit chronischer Sarkoidose	Pabst (2006) ¹⁷⁷
	Andere	
Myokardinfarkt (Asp299Gly)	Niedrigeres Myokardinfarkttrisiko unter Statintherapie	Holloway (2005) ¹⁰¹
Myokardinfarkt (Asp299Gly)	Geringeres Myokardinfarkttrisiko	Balistreri (2004) ^{17, 51}
Myokardinfarkt (Asp299Gly /Thr399Ile)	Erhöhtes Myokardinfarkttrisiko für männliche Polymorphismenträger	Edfeldt (2004) ⁶²
Atherothrombose (Asp299Gly /Thr399Ile)	Assoziiertes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und einen höheren Benefit von einer Statintherapie für Asp299Gly	Boekholdt (2003) ²⁵
Akutes Koronarsyndrom (Asp299Gly)	Assoziation mit akutem Koronarsyndrom, Beteiligung an Prozessen der Karotiden- und Femoralarterienatherosklerose	Ameziane (2003) ¹⁰
Atherosklerose (Asp299Gly)	Vermindertes Atheroskleroserisiko	Kiechl (2002) ¹¹³
KHK, Diabetes (Asp299Gly)	CRP-Levelreduktion, erniedrigtes KHK- und Diabetesrisiko	Kolek (2004) ¹¹⁹
Diabetes (Asp299Gly /Thr399Ile)	Niedrigere Prävalenz einer diabetischen Neuropathie bei Polymorphismusträgern mit Diabetes mellitus 2	Rudofsky (2004) ²⁰⁰
Makuladegeneration (Asp299Gly /Thr399Ile)	Erhöhtes Risiko für AMD bei Asp299Gly ohne unabhängigen Effekt für Thr399Ile	Zarepars (2005) ²⁶⁶

Tabelle 33: Signifikante Assoziation zu den TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und / oder Thr399Ile

Die in dieser Studie gewonnenen Daten unterstützen die initiale Hypothese, dass TLR4 einen relevanten Pathogenesefaktor für Morbus Crohn darstellt, indem sie eine Assoziation zwischen dem TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus und Morbus Crohn aufzeigen. Die Häufigkeitsverteilung ist dabei mit 14,2% Polymorphismusträgern in der Crohn-Studienpopulation gegenüber einem geringeren Anteil in der Kontrollgruppe von 7,5% mit einem P-Wert von 0,038 signifikant. Jedoch im Vergleich zur vor einiger Zeit beschriebenen Assoziation des Morbus Crohn mit bestimmten NOD2-Mutationen ist diese Verknüpfung - mit einer OR von 2,03 für heterozygote Träger des Asp299Gly-Polymorphismus in unserer Studienpopulation - weniger ausgeprägt. Das durch heterozygote oder homozygote Veränderungen übertragene NOD2 genotyp-spezifische Erkrankungsrisiko wurde 2001 in einer deutsch-britischen Studienpopulation auf einen Anstieg um das 2,6- bis 42,1fache quantifiziert.⁸⁷ Die Prävalenz Morbus Crohn-assoziiierter NOD2-Mutationen in unserem Patientenkollektiv beträgt 37,7%, wohingegen nur 14,2% der Patienten heterozygot für die Asp299Gly-Aminosäuresubstitutionen sind. Der Thr399Ile-Polymorphismus, der gegenüber der Kontrollgruppe mit $P = 0,128$ (OR = 1,63) keine signifikante Frequenzerhöhung im Patientengut aufweist, ist im Übrigen in unserer Morbus Crohn-Population mit 14,7% gleichfalls zu einem deutlich geringeren Anteil vertreten. Die Ergebnisse neuerer europäischer Studien, die ebenfalls den Zusammenhang zwischen TLR4-Polymorphismen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen fokussiert haben, verhalten sich hinsichtlich der prozentualen TLR4-Genotyp-Anteile ähnlich, wie Abbildung 14 exemplarisch für Asp299Gly deutlich veranschaulicht.

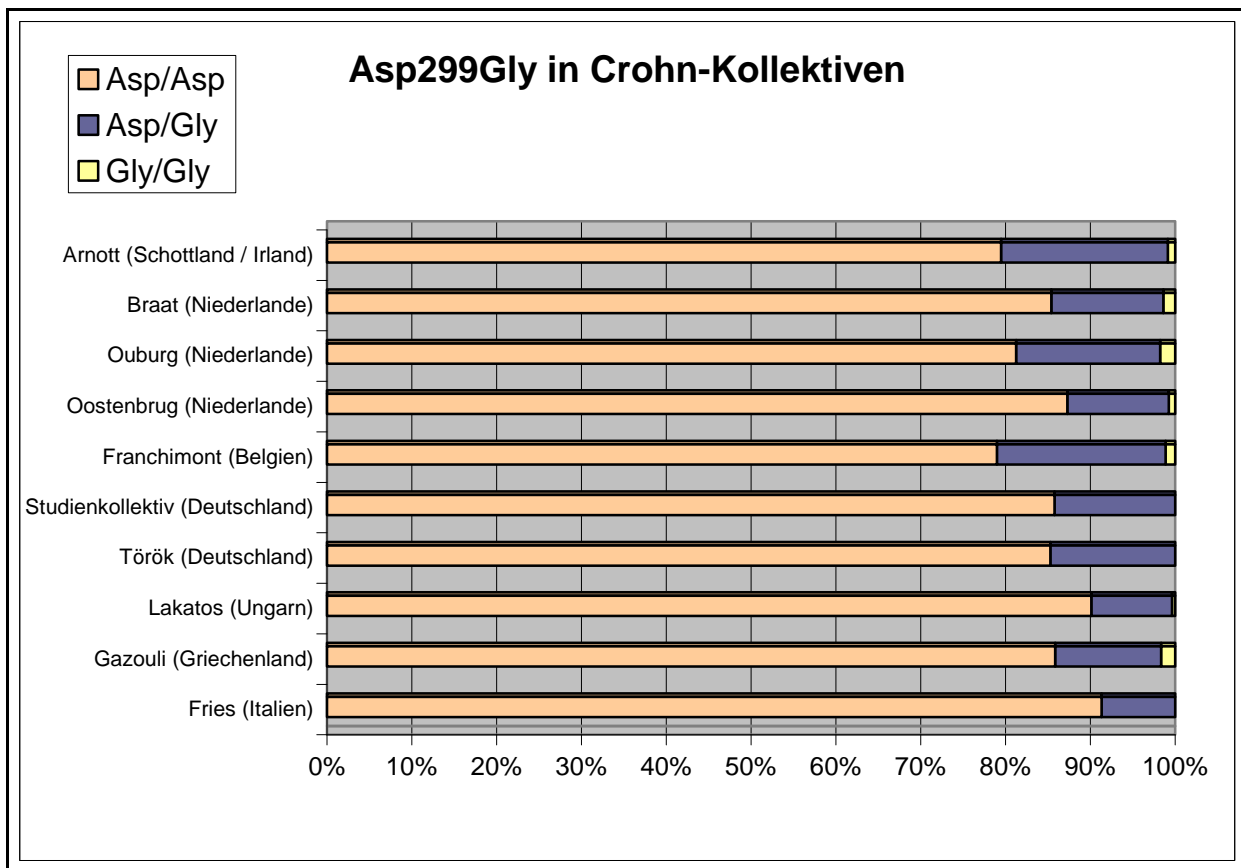


Abbildung 14: Relation der Asp299Gly-Genotyp-Verteilung dieses Studienkollektivs zu anderen Studien
 15, 27, 175, 171, 74, 247, 123, 80, 76

So liegt in den Morbus Crohn-Kollektiven die Genotyp-Frequenz für den Wildtyp Asp/Asp im Bereich von 78,8-91,3%, für Asp/Gly zwischen 8,7-19,9% sowie für Gly/Gly bei Morbus Crohn zwischen 0-1,7%. Für die Threonin-Isoleucin-Substitution liegen weniger Vergleichsdaten vor. Die in drei Untersuchungen ermittelte Verteilung der Thr399Ile-Genotypen schwankt für den homozygoten Wildtyp Thr/Thr zwischen minimalen 85,0% und maximalen 99,2%. Heterozygote (Thr/Ile) machen bei den Morbus Crohn-Patienten zwischen 0,8% und 16% aus. Homozygote für die Thr399Ile-Aminosäuresubstitution (Ile/Ile) sind mit einem durchschnittlichem Vorkommen von 0-1% ebenso selten wie bei Asp299Gly. Das eigene Studienkollektiv umfasst weder einen einzigen Patienten noch eine einzige gesunde Kontrolle mit homozygoten mutierten TLR4-Allelen, was geringfügig unter der Erwartung der Hardy-Weinberg-Berechnung liegt. Jedoch besteht hierbei keine statistische Signifikanz. Der Vergleich mit einem breiteren Spektrum mit themenfremden Studien zeigt außerdem für die ermittelten Genotypfrequenzen der Morbus-Crohn-Patienten keine außergewöhnlichen Abweichungen. CED-unabhängig liegen die Anteile der beiden TLR4-Wildtypen bei 74-100 %, die der Heterozygoten bei 0-26 % und die der homozygoten Glycin- bzw. Isoleucin-Allelträger bei 0-4 % bzw. 1% (Tabelle 36). Die Relationen der Genotyp-Frequenzen der

Morbus Crohn-Patienten bewegen sich somit genau in diesen Grenzen. Demzufolge lässt sich, ohne Bezug zur Kontrollgruppe, aus diesem Parameter keine besondere Bedeutung der TLR4-Polymorphismen ableiten.

Auffallend bezüglich der TLR4-Genotypen ist das weitgehend simultane Auftreten der mutierten Allele. Im eigenen Kontrollkollektiv finden sich lediglich vier Individuen mit dem Genotyp Asp299Gly-/Thr399Ile+, was bezogen auf die Anzahl aller gesunden Polymorphismusträger einer Kosegregationsrate von 98,0% entspricht. In der untersuchten Großhaderner Morbus Crohn-Gruppe lag bei 98,5% eine Allel-Assoziation vor. Im Detail bedeutet dies, dass nur drei der Patienten einen der Polymorphismen isoliert aufweisen. Dieses bereits 2000 von Arbour et. al.¹³ beschriebene Phänomen der Asp299Gly und Thr399Ile-Kosegregation wird durch die vorhin hinsichtlich der Genotypfrequenz erörterten themaspezifischen TLR4-Studien eindeutig bestätigt. In der deutschen Studienkohorte von Török et al. fiel sogar eine 100%ige Kosegregation in der Kontrollkohorte auf, wobei aber die Anteile im Colitis ulcerosa- bzw. beim Morbus Crohn-Kollektiv mit 86% bzw. 94% niedriger lagen.²⁴⁷ In Griechenland war die Koexistenz nicht so hoch, soweit sich aus den gemachten Angaben hierzu eine Aussage überhaupt ableiten lässt.⁸⁰ In der niederländischen Studie von Van 't Veer wurden die Daten nicht detailliert publiziert, es wird jedoch ebenfalls von einer Kosegregation ausgegangen.²⁵² In einer anderen niederländischen Studie wird von nur zwei bzw. neun von insgesamt 1419 Individuen mit den Kombinationsgenotypen Asp299Gly+/Thr399Ile- bzw. Asp299Gly-/Thr399Ile+ berichtet, was einem simultanen Auftreten von 99,2% gleichkommt.¹⁷⁰ Auch die Einordnung der Resultate aus dem eigenen Studienkollektiv in den Kontext nicht auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen bezogener TLR4-Assoziationsstudien erbringt nichts Gegenteiliges. In den meisten TLR4-Studien, die den Asp299Gly und den Thr399Ile-Polymorphismus gleichermaßen untersuchten, wird von einem starken Kopplungsungleichgewicht berichtet (Tabelle 34).^{23, 25, 62, 82, 100, 106, 113, 139, 142, 153, 178, 179, 190, 192, 200, 206, 215, 266} Dieses liegt zumeist in einem Bereich, der die 90%-Grenze deutlich übersteigt; gelegentlich erreicht es insgesamt oder in einer der Studienteilkohorten auch 100%.^{3, 141, 177, 234, 250, 258} Das schwächste Kopplungsungleichgewicht mit aus den publizierten Angaben errechneten 82,8% wurde im Rahmen einer afrikanischen Untersuchung zu Malaria erhoben. Alle Studienteilnehmer mit dem mutierten Thr399Ile-Allel wiesen zwar in allen Fällen gleichzeitig auch die Asp299Gly-Variante auf, aber bei der umgekehrten Betrachtung hatten nur 16% beide Polymorphismen.¹⁵⁰ Demgemäß tritt das beschriebene Kopplungsungleichgewicht nicht Morbus Crohn-spezifisch auf, sondern ist ein allgemeines Merkmal mit leichten ethnischen Unterschieden.

TLR4-Kopplungsungleichgewicht			
Studienfokus	Nationalität	Aussage zur Kosegregation	Autor (Jahr)
Candida-Blutinfektion	Niederlande	100% in der Patientengruppe versus 98,8% in der Kontrollgruppe	Van der Graaf (2006) ²⁵⁰
Nekrotisierende Enterokolitis bei sehr niedrigem Geburtsgewicht	Ungarn	100%ige Kosegregation in der Patientengruppe und inkomplettes aber stark ausgeprägtes Kopplungsungleichgewicht bei den Kontrollen	Szebeni (2006) ²³⁴
Osteomyelitis	Spanien	Inkomplette, aber hohe Kosegregation	Montes (2006) ¹⁵³
Malaria	Afrika	Niedrigste Kosegregationsrate mit errechneten 82,8%* bezüglich aller Untersuchten	Mockenhaupt (2006) ¹⁵⁰
Frühgeburtlichkeit	Finnland	Assoziation in 98,6% der Fälle	Lorenz (2002) ¹³⁹
Gramnegative Sepsis	Frankreich	94,5%* in der Patientengruppe versus 100% in der Kontrollgruppe	Lorenz (2002) ¹⁴¹
Gramnegative Infektionen	USA	100% Kosegregation	Agnese (2002) ³
Graft-versus-Host-Disease	USA	98,9%* im Gesamtkollektiv	Lorenz (2001) ¹⁴²
Lungentransplantation	USA	96,7%* im Gesamtkollektiv	Palmer (2003) ¹⁷⁸
Nierentransplantation	USA	95,9%* im Gesamtkollektiv	Palmer (2006) ¹⁷⁹
Fehlgeburten	Kanada	98,0% im Gesamtkollektiv	Hirschfeld (2006) ¹⁰⁰
Karotisendarteriektomie	USA	99,3%* im Gesamtkollektiv	Beutler (2002) ²³
Myokardinfarkt	Schweden	99,3%* im Gesamtkollektiv	Edfeldt (2004) ⁶²
Statintherapie	Niederlande	98,6%* im Gesamtkollektiv	Boekholdt (2003) ²⁵
Atherogenese	Italien	98,9%* im Gesamtkollektiv	Kiechl (2002) ¹¹³
Glucosestoffwechsel	Deutschland	> 90% der Fälle	Illig (2003) ¹⁰⁶
Diabetes	Deutschland	99,1%* im Gesamtkollektiv	Rudofsky (2004) ²⁰⁰
Asthma	Deutschland	100% im Gesamtkollektiv	Werner (2003) ²⁵⁸
Asthma / Atopie	Nordamerika und Kanada	Hohe Kosegregation bei hellhäutigen Amerikanern, aber nur moderat bei Afroamerikanern	Raby (2002) ¹⁹⁰
Spondylarthropathien	Ungarn	Starkes Kopplungsungleichgewicht	Gergely(2006) ⁸²
Sarkoidose	Deutschland	100% im Gesamtkollektiv	Pabst (2006) ¹⁷⁷
Rheumatoide Arthritis / Systemischer Lupus erythematodes	Spanien	Inkomplettes Kopplungsungleichgewicht	Sanchez (2004) ²⁰⁶
Multiple Sklerose	Österreich	99,6%* im Gesamtkollektiv	Reindl (2003) ¹⁹²
Altersbezogene Makuladegeneration	USA	94,5%* im Gesamtkollektiv	Zareparsi (2005) ²⁶⁶
LPS-Reaktion	Deutschland	99,1%* im Gesamtkollektiv	Schmitt (2002) ²¹⁵

Tabelle 34: Zusammenfassung der Aussagen zum Kopplungsungleichgewicht zwischen Asp299Gly und Thr399Ile in verschiedenen nicht auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen fokussierten Studien.

* Aus den gegebenen Daten nachträglich errechnet.

Hinsichtlich der Assoziation der TLR4-Polymorphismen zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liefern die betrachteten aktuellen Studien inkonsistente Resultate (Tabelle 35).

Die Häufigkeit der TLR4-Polymorphismen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in anderen Studien						
Genotyp		Kollektive	Allelfrequenz (Gly / Ile)	Erkrankung (Assoziation)	Land	Autor (Jahr)
Asp/Asp	21 / 50 / 57	MC n = 23	4,3%	MC	Italien	Fries (2005) ⁷⁶
Asp/Gly	2 / 10 / 2	V n = 60	8,3%	(Asp299Gly -)		
Gly/Gly	0 / 0 / 0	K n = 59	1,7%			
Asp/Asp	103 / 79 / 95	MC n = 120	7,92%	MC	Griechenland	Gazouli (2005) ⁸⁰
Asp/Gly	15 / 6 / 4	CU n = 85	3,53%	(Asp299Gly +, Thr399Ile -);		
Gly/Gly	2 / 0 / 1	K n = 100	3%	CU		
Thr/Thr	119 / 82 / 2	MC n = 120	0,42%	(Asp299Gly -, Thr399Ile -)		
Thr/Ile	1 / 3 / 0	CU n = 85	1,76%			
Ile/Ile	0 / 0 / 1	K n = 100	-			
Asp/Asp	475 / 176	MC n = 527	5,1% [‡]	MC	Ungarn	Lakatos (2005) ¹²³
Asp/Gly	50 / 23	K n = 200	6,2% [‡]	(Asp299Gly -)		
Gly/Gly	2 / 1					
Asp/Asp	91 / 153	MC n = 112	9,9% [‡]	MC	Niederlande	Ouburg (2005) ¹⁷⁵
Asp/Gly	19 / 16	K n = 170	5,1% [‡]	(Asp299Gly +)		
Gly/Gly	2 / 1					
Asp/Asp	343 / 159 / 17 / 269	MC n = 393	6,7%	MC	Niederlande	Oostenbrug (2005) ¹⁷¹
Asp/Gly	47 / 19 / 2 / 27	CU n = 179	5,9%	(Asp299Gly -, Thr399Ile -)		
Gly/Gly	3 / 1 / 0 / 0	CI n = 19	5,6%	CU		
Thr/Thr	440 / 194 / 21 / 270	MC n = 504	6,8%	(Asp299Gly -, Thr399Ile -)		
Thr/Ile	59 / 22 / 4 / 29	CU n = 217	5,5%			
Ile/Ile	5 / 1 / 0 / 0	CI n = 25	8,9%			
		K n = 299	4,8%			
Asp/Asp	87 / 81 / 132 *	MC n = 102	7%	MC	Deutschland	Török (2004) ²⁴⁷
Asp/Gly	15 / 15 / 13 *	CU n = 98	9%	(Asp299Gly -, Thr399Ile -)		
Gly/Gly	0 / 1 / 0 *	K = 145	4%	CU		
Thr/Thr	86 / 78 / 132 *	MC n = 102	8%	(Asp299Gly -, Thr399Ile +)		
Thr/Ile	16 / 19 / 13 *	CU n = 98	11%			
Ile/Ile	0 / 1 / 0 *	K = 145	4%			
Asp/Asp	186 / 212 / 157 *	MC n = 234	10,3%	MC	Schottland / Irland	Arnott (2004) ¹⁵
Asp/Gly	46 / 32 / 31 *	CU n = 246	6,8%	(Asp299Gly -)		
Gly/Gly	2 / 2 / 1 *	K n = 189	8,8%	CU (Asp299Gly -)		
Asp/Asp	265 / 88 / 133 / 126	MC ^{Leuven} n = 334	10,9%	MC	Belgien	Franchimont (2004) ⁷⁴
Asp/Gly	65 / 24 / 28 / 12	MC ^{Brüssel} n = 113	11,5%	(Asp299Gly +)		
Gly/Gly	4 / 1 / 2 / 1	CU n = 163	9,8%	CU (Asp299Gly +)		
Asp/Asp	130 / 122	CU n = 163	10,1%	CU	Belgien	Pierik (2003) ¹⁸²
Asp/Gly	31 / 13	K n = 136	5,2%	(Asp299Gly +)		
Gly/Gly	2 / 1					
Asp/Asp	304 / 213 / 150	MC n = 356	7,6% [‡]	MC	Niederlande	Baat (2003) ²⁷
Asp/Gly	47 / 29 / 14	CU n = 244	6,6% [‡]	(Asp299Gly +)		
Gly/Gly	5 / 2 / 0	K n = 164	4,4% [‡]	CU (Asp299Gly -)		

Tabelle 35: Die Häufigkeit der TLR4-Genotypen in anderen Studien zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Angaben zu Thr399Ile nur bei entsprechenden Daten angegeben. * Diese Werte wurden aus den gemachten Prozentangaben der Autoren, rechnerisch nachvollzogen. ‡ Diese Werte wurden nach der Hardy-Weinberg-Formel nachträglich errechnet. MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, CI = Colitis indeterminata, K = Kontrollen, V = Verwandte

So konnte in einer belgischen Kohorte eine positive Asp299Gly-Assoziation mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa festgestellt werden.⁷⁴ In zwei verschiedenen niederländischen Studienpopulationen hingegen, ließ sich zwar eine Assoziation mit Morbus Crohn, aber nicht mit Colitis ulcerosa konstatieren.^{27, 252} Ouburg et al. ermittelte in einem weiteren niederländischem Crohn-Kollektiv eine signifikante Asp299Gly-Frequenzerhöhung gegenüber der Kontrollgruppe.¹⁷⁵ In einer weiteren niederländischen und auch einer schottischen Studie dagegen konnte überhaupt kein Zusammenhang der beiden untersuchten Polymorphismen zu einer der beiden chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ermittelt werden.^{15, 170} Auch in einer süditalienischen Arbeitsgruppe mangelte es an einer Assoziation zwischen Asp299Gly und Morbus Crohn. Erwähnenswert ist aber die um das Fünffache erhöhte Frequenz des untersuchten mutierten TLR4-Allels bei den Verwandten der Patienten.⁷⁶ Interessanterweise ergab eine in Deutschland nahezu parallel durchgeführte Studie eine Verknüpfung des Thr399Ile-Allels mit Colitis ulcerosa, aber nicht mit Morbus Crohn.²⁴⁷ Die aus den Daten unserer Studie abgeleitete Aussage hinsichtlich der Korrelation Crohn-Thr399Ile stimmt damit überein. Im Kontrast zu den Resultaten der Großhaderner Studie konnte – vermutlich aufgrund der kleineren Crohn- und Kontrollkohorten - keine signifikante Assoziation zwischen Asp299Gly und Morbus Crohn festgestellt werden. Jedoch fiel immerhin ein Trend zu einem Allelfrequenzanstieg für beide mutierten Allele bei Morbus Crohn bzw. für den Asp299Gly-Polymorphismus bei Colitis ulcerosa auf.²⁴⁷ Die von Gazouli et al. untersuchte, etwas größere griechische Morbus Crohn-Kohorte bestätigt dagegen exakt die Ergebnisse unserer Arbeit – signifikante Frequenzerhöhung zwischen Morbus Crohn-Patienten und Kontrollen für den Austausch von Asparagin durch Glycin und keine sichere Assoziation zur Thr399Ile-Allelvariante. In dieser Arbeitsgruppe konnte im Übrigen kein Zusammenhang zwischen einem der beiden Polymorphismen zur Colitis ulcerosa festgestellt werden.⁸⁰ Wie Abbildung 15 zusammenfassend aufzeigt, konnte in keiner der Studien eine direkte Korrelation zum Thr399Ile-Polymorphismus nachgewiesen werden. Bezüglich Asp299Gly deutet die knappe Mehrzahl der Studien auf eine Assoziation hin. Die Verteilung der zahlenstarken und infolgedessen gewichtigeren Kohorten für und gegen die Assoziation ist dabei ausgewogen. So stehen Franchimonts und Braats große Kollektive den ebenbürtigen Gruppen Oostenbrugs und Lakatos` gegenüber.^{27, 74, 123, 171} Zu den Resultaten der Arbeitsgruppe um Oostenbrug ist jedoch hinzuzufügen, dass die Negierung des Zusammenhanges sich lediglich auf die Frequenz der beiden erörterten TLR4-Polymorphismen bezieht. Es wird sogar eine indirekte Verknüpfung zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermutet. Basierend auf einer Mikrosatellitenanalyse stellt Oostenbrug die Hypothese auf, dass zwar die Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile in keinem

kausalem Zusammenhang stehen, aber das TLR4-Gen anderweitig mit dem Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen verbunden ist. Ferner wird die Möglichkeit eines protektiven Effekts des Wildtyps bei der Koexistenz anderer krankheitsauslösenden TLR4-Varianten in Betracht gezogen. Möglicherweise ist die Erklärung für die Ergebnisinkonsistenz der Asp299Gly-Studien in der Kausalität anderen Abweichungen in der TLR4-Region zu suchen.

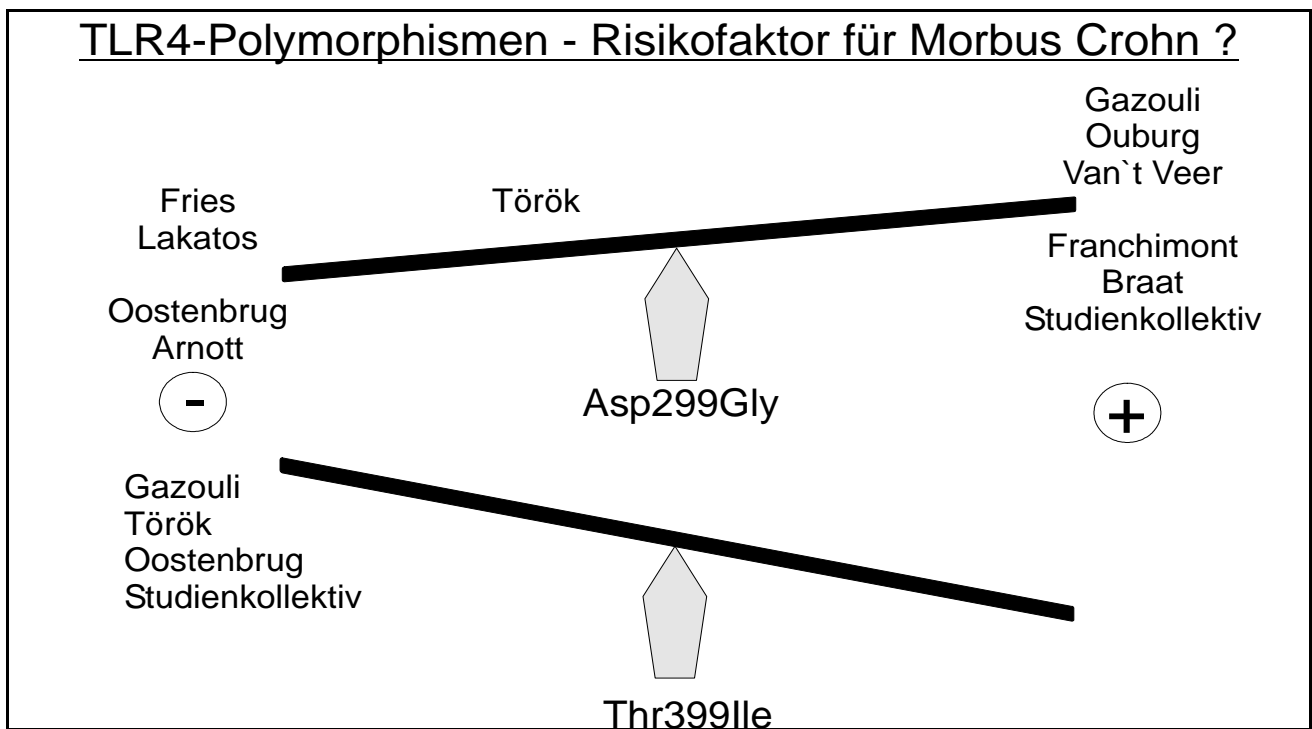


Abbildung 15: Graphische Aufarbeitung der verschiedenen Studienergebnisse bezüglich der TLR4-Assoziation zu Morbus Crohn

Als weitere Ursachen für diese Resultatwidersprüchlichkeit kommen, neben der Beschaffenheit der diversen Kollektive, ethnische bzw. geographische Unterschiede in Frage. Von allen beschriebenen TLR4-Polymorphismen, die insgesamt betrachtet eine beachtliche Allelheterogenität aufweisen, ist die besagte Asp299Gly-Aminosäuresubstitution am meisten in der weißhäutigen sowie auch der afrikanischen Bevölkerung verbreitet²²⁷, wobei sie im Kontrast dazu, in der asiatischen Population sehr selten vorkommt.^{91, 159, 164, 168} Der weitere in dieser Studie untersuchte Polymorphismus Thr399Ile stellt die zweithäufigste auf Proteinsynthese-Ebene relevante TLR4-Allelvariante in der kaukasischen Bevölkerung dar. Auch er tritt relativ häufig bei afrikanischen Individuen und selten bei Asiaten auf.^{91, 159} Demgemäß liegen also in ethnischer Hinsicht ähnliche Prävalenz-Verhältnisse wie bei den NOD2-Mutationen vor.¹⁰⁸ Diese ethnischen Besonderheiten in der TLR4-Epidemiologie spiegeln sich auch weitgehend in den geographischen Verhältnissen wieder (Tabelle 36).

Weltweites Vorkommen von Asp299Gly und Thr399Ile							
Gebiet	Allelfrequenz		Genotypfrequenz		Homozygotie		Referenzen
	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly/Gly	Ile/Ile	
E U R O P A							
Nordeuropa	4,5-10,6%	4,8-5,9%	8,8-20,5%	9,4-11,4%	0,07-0,6%	Keine Daten	62, 139, 269
Osteuropa	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	—
Mitteleuropa	2,8-9,6%	2,8-8,6%	5,7-16,5%	5,7-16,5%	0,0-1,1%	0,0-1,1%	6, 82, 106, 123, 177, 192, 200, 215, 234, 247, 258
Westeuropa	3,1-14,0%	3,4-14,0%	6,2-25,6%	6,6-26,0%	0,0-4,1%	0,0-0,6%	2, 10, 15, 25, 27, 42, 74, 101, 124, 141, 155, 160, 171, 175, 204, 250-252
Südeuropa	1,7-11%	5,0-10,0%	3,4-18,8%	5,7-15,5%	0,0-3,8%	0,0-3,5%	76, 80, 113, 153, 206
A U ß E R E U R O P Ä I S C H E K O N T I N E N T E							
Afrika	9,5-12,9%	1,2-3,3%	17,6-22,8%	2,4-6,2%	0,7-1,7%	0,0-0,3%	42, 150
Asien	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	91, 159, 164, 168
Amerika	0,0-14,6%	2,6-9,5%	0,0-18,2%	7,9-18,2%	0,0-1,6%	0,0-1,2%	3, 13, 23, 36, 68, 70, 81, 100, 119, 142, 178, 179, 190, 266, 267
Australien	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	Keine Daten	—

Tabelle 36: Weltweites Vorkommen der TLR4-Polymorphismen in nicht-CED-assoziierten Studien bzw. ausschließlich in den Kontrollkollektiven der CED-Studien

Insgesamt sind also die erörterten Differenzen vermutlich auf einen unterschiedlichen ethnischen Hintergrund, wie ihn Arnott et al. für NOD2-Mutationen aufzeigt¹⁵, zurückzuführen. Außerdem tragen einerseits Abweichungen in den designierten Krankheitsphänotypen als auch die mangelnde Eignung einiger dieser Studien mit kleiner Fallzahl, eine dezentere Assoziation zu entdecken, andererseits zu den Widersprüchen bei.²⁴⁷ Trotzdem untermauert der Großteil der durchgeführten Studien die Hypothese, dass die analysierten TLR4-Polymorphismen, im Gegensatz zu NOD2-Mutationen eher untergeordnete, genetische Prädiktoren für die Entwicklung eines Morbus Crohn in der europäischen Bevölkerung darstellen.

Im Juli 2007 wurde eine erste Studie veröffentlicht, die den TLR4-Polymorphismus Asp299Gly zusammenfassend analysiert.⁵⁰ Es wurden bei den miteinbezogenen 4805 Fällen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen die initial publizierte Arbeit von Franchimont et al.⁷⁴, die auch hier hinzugezogenen Replikationsstudien als auch die veröffentlichten Daten der hier vorliegenden Großhaderner Studie berücksichtigt. Zusätzlich genotypisierten De Jager, Franchimont et al. 1539 Fälle chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Die Assoziation des TLR4-Allels mit einem Risiko für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (OR = 1.30, 95% CI = 1.15-1.48; P=0.00017) und Morbus Crohn (OR = 1.33, 95% CI = 1.16-1.54; P=0.000035) wurde so validiert. Die unterschiedlichen Resultate der einzelnen Studien wurden ebenfalls auf die oben genannten Aspekte zurückgeführt. Somit kann Asp299Gly als ein Risikofaktor bezeichnet werden.

4.2 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

4.2.1 Krankheitsverlauf

Mit Hilfe der Vienna-Klassifikation zur systematischen Phänotypisierung des Studienkollektivs, konnte eine vermehrte Häufigkeit des strikturierenden Phänotyps (B2) bei den heterozygoten Trägern von mindestens einem der beiden TLR4-Polymorphismen ermittelt werden. Insbesondere kann gerade für diejenigen Patienten mit vorhandener TLR4-Aminosäuresubstitution ohne additives Auftreten einer der drei geläufigsten Mutationen des NOD2-Gens – Arg702Trp, Gly908Arg, Leu3020insC – ein Risiko für diesen Phänotyp festgestellt werden. So macht diese genetische Subgruppe TLR4+/NOD2-, bei einem Vorkommen von 10,4% des reziproken Genotyps TLR4-/NOD2+, einen signifikant größeren Anteil (47,4%) bei den Patienten mit B2-Verlauf aus ($P = 0,0009$). Auch gegenüber allen anderen Morbus Crohn-Subgruppen ist die Frequenz des Genotyps TLR4+/NOD2- mit $P = 0,0037$ beim strikturierenden Phänotyp statistisch signifikant erhöht. In der TLR4-/NOD2+ Untergruppierung dagegen besteht, bezogen auf die TLR4+/NOD2- -Entität, ein Trend zu einer höheren Prävalenz des penetrierenden Phänotyps (B3), was allgemein als die schwerste Verlaufsform erachtet wird. In Zahlen ausgedrückt, bedeutet dies, dass 71,6% der NOD2-Positiven ohne TLR4-Veränderung 47,4% der reziproken Subgruppe TLR4+/NOD2- gegenüberstehen, wobei bei einem P-Wert von 0,059 nicht mehr von einer Signifikanz, sondern lediglich von einem Trend gesprochen werden kann.

In dieser Studie konnte sowohl im Patientenkollektiv als auch in der Kontrollgruppe kein einziger homozygoter TLR4-Phänotyp gefunden werden. Es bleibt demzufolge offen, ob homozygote TLR4-Polymorphismusträger nicht, ebenso wie die homozygoten NOD2-Mutation Leu3020insC Träger, für einen gravierenderen Krankheitsphänotyp prädisponiert sind.^{219, 220} Ein Dosiseffekt für die TLR4-Polymorphismen wäre prinzipiell durchaus denkbar. Zumindest konnte bereits in einer Studie mit Osteomyelitis-Patienten eine Wirkungsverstärkung des mutierten Asp299Gly-Allels bei Homozygotie festgestellt werden.¹⁵³ Jedoch erlaubt das seltene Vorkommen von Asp299Gly- bzw. Thr399Ile-Homozygoten auch unter Einbeziehung vergleichbarer CED-Studien keine definitive Aussage bezüglich eines Dosis-Effektes bei Morbus Crohn. Hierzu könnte nur eine großangelegte Multizenterstudie Aufschluss bringen. Ähnlich verhält es sich für das isolierte Auftreten einer der beiden TLR4-Polymorphismen. Durch die hohe Kosegregationsrate finden sich die Genotypen Asp299Gly-/Thr399Ile+ und Asp299Gly+/Thr399Ile- so selten, dass hinsichtlich einer Assoziation mit bestimmten Manifestationscharakteristika keine Aussage getroffen werden kann.

Außerdem weist die in der Studie zur Ermittlung der diversen Genotyp-Phänotyp-Korrelationen angewandte Vienna-Klassifikation einige spezifische Probleme auf, die bei der

Interpretation der erhaltenen Resultate bedacht werden sollten. Aktuell wird europaweit eine Revision der bisherigen Klassifikation mit neuer Einteilung der CED-Phänotypen angestrebt.^{193, 226} Ahmad et al. lieferten bereits 2002 einen Ansatz zur molekularen CED-Klassifikation, mittels welchem bestimmten Phänotypen ein spezifischer Genotyp zugeordnet wird.⁴ 2005, nach Abschluss der vorliegenden Großhaderner Morbus Crohn-Studie, erarbeiteten Silverberg et al. auf dem Gastroenterologie-Weltkongress in Montreal ein verbessertes integratives CED-Klassifikationssystem unter Berücksichtigung klinischer, serologischer und genetischer Parameter, das einige Defizite der Vienna-Klassifikation beseitigt.²²⁶ Die Probleme der Einteilung nach Vienna liegen zum einen in der Phänotyp-Zuordnung durch den Anwender und zum anderen in der Definition selbst. So schließt ein penetrierender Phänotyp gemäß Vienna-Klassifikation keinesfalls die Existenz einer Striktur aus, was insbesondere im Fall einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu Verzerrungen führen kann. Als Beispiel hierzu, bietet sich die Asp299Gly-positive Subpopulation dieser Untersuchung an, in der 79,3% der Patienten Verengungen in der Krankheitsgeschichte aufweisen, wobei aber nur 34,5% als strikturierender B2-Phänotyp klassifiziert wurden. Die durchaus beachtliche Differenz von 44,8% verbirgt sich in den 48,3% der penetrierend-B3-Klassifizierten dieser Subgruppe, in der die Mehrheit eine intestinale Striktur hatte.

Außerdem handelt es sich beim Morbus Crohn nach allgemeinem Verständnis um eine „dynamische“ Erkrankung, mit einer hohen Tendenz, den Verlauf mit zunehmender Krankheitsdauer zu ändern. So haben Patienten mit einem bislang rein inflammatorischen Krankheitsbild ohne jegliche strikturierende oder penetrierende Komplikationen im Laufe der Zeit eine hohe Wahrscheinlichkeit für einen Krankheitsprogress zu einer komplikationsträchtigeren Manifestation.^{43, 143} Dies äußert sich bei der Phänotypisierung nach Vienna in Form eines Überganges der Verlaufgruppen von B1 zu B2 oder B3 bzw. von B2 zu B3. In der untersuchten Studienpopulation besteht eine Assoziation zwischen dem penetrierendem Phänotyp und der Erkrankungsdauer. Allerdings fiel zwischen den drei TLR4-Subgruppen Wildtyp, Asp299Gly und Thr399Ile diesbezüglich kein relevanter Unterschied auf (10,1±8,0; 10,7±9,4; 10,9±9,2 Jahre Erkrankungsdauer). Folglich ist die beobachtete Komposition dieser Teilmengen hinsichtlich der Krankheitsschwere nicht auf einen Unterschied in der zeitlichen Dimension zurückzuführen. Überdies schließt jedoch die insgesamt hohe Inzidenz der strikturierenden (19,6%) und penetrierenden (62,7%) Crohn-Manifestation in der Studienpopulation die Möglichkeit der weiteren Progression bei der Mehrheit der Patienten aus. So besteht das Patientenkollektiv insgesamt zu 82,3% aus komplikationsbehafteten Verläufen (B2 + B3). Nur 17,7% der Krankengeschichten in der untersuchten Kohorte sind ausschließlich inflammatorisch (B1). Bei der Aufschlüsselung nach Erstdiagnosealter ist dieser Trend

sogar noch etwas deutlicher: 83,5% der vor dem 40. Lebensjahr Erkrankten weisen anamnestisch Komplikationen auf; wohingegen immerhin 25% der später Diagnostizierten B1 zuzuordnen sind. Unabhängig vom Erstdiagnosealter macht B3 den größten Anteil in der untersuchten Crohn-Kohorte aus (insgesamt 62,7% in A1 63,6%; in A2 57,1%). Zusätzlich bekräftigt eine logistische Regressionsanalyse die positive Assoziation des Asp299Gly-Polymorphismus mit dem strikturierendem Phänotyp; während der penetrierende Phänotyp dabei mit NOD2-Mutationen und der Erkrankungsdauer verknüpft war.

Die statistische Aufarbeitung einer großen Anzahl an Untergruppen – wie in der unternommenen Studie – ergibt zwangsläufig signifikante Interaktionen, was als das sogenannte Mehrfachtestungsproblem bezeichnet wird.¹⁶ Jedoch wurde die Assoziation der Strikturen und der TLR4-positiven Subgruppe durch das Vergleichen der TLR4+/NOD2- -Gruppe mit den gesamten anderen Crohn-Patienten des Kollektivs bestätigt ($P = 0,0037$). Außerdem war der B2-Phänotyp, verhältnismäßig zur TLR4-Wildtypgruppe mit 17,1%, bei den Asp299Gly-positiven Patienten mit 34,5% signifikant häufiger ($P = 0,04$). Die Korrelation zwischen dem SNP Asp299Gly und dem strikturierenden Verlauf ist infolgedessen mit hoher Wahrscheinlichkeit gegeben.

Die erwähnte Montreal-Klassifikation von Silverberg et al. versucht einige dieser Probleme der Phänotyp-Analyse nach Vienna zu umgehen. Die große Anzahl der Subgruppen, die zu einem Mehrfachtestungsproblem führen, bleibt dabei jedoch bestehen. Der Krankheitsdynamik des Morbus Crohns versucht das Schema durch die Berücksichtigung der Krankheitsdauer gerecht zu werden. Die endgültige Eingruppierung des Phänotyps soll erst nach Ablauf einer gewissen Erkrankungsdauer erfolgen. Als Kompromisslösung werden fünf Krankheitsjahre vorgeschlagen, wobei auf Grund der Phänotypstabilität zehn Jahre für eine genetische Untersuchung möglicherweise als sinnvoller zu erachten wären. Die Einbindung der zeitlichen Komponente dient zusätzlich dazu, den primären Krankheitsverlauf bei der Koexistenz von Komplikationen besser herausfiltern zu können. Perianale Fisteln, die nur selten mit enterischen Fisteln einhergehen, werden als weiterer Phänotyp gewertet und durch die Einführung des Modifikators p in den B-Gruppen gekennzeichnet. Hinsichtlich der Befallslokalisation wird noch ein L4-Modifikator in die Klassifikation integriert, der die Koexistenz der Manifestation im oberen Gastrointestinaltrakt in L1 bis L3 kenntlich macht. Darüberhinaus wird die Erhebung weiterer Daten ethnischer und geographischer Natur, sowie serologischer und genetischer Parameter, empfohlen.²²⁶

Montreal-Klassifikation				
Gruppe			Definition	Modifikation
A	Erstdiagnosealter	A1	Erstdiagnose vor dem 16. Lebensjahr *	
		A2	Erstdiagnose zwischen dem 17. und 40. Lebensjahr	
		A3	Erstdiagnose nach dem 40. Lebensjahr	
				Perianale Erkankung *
B	Krankheitsverlauf	B1	Nicht-strikurierend, nicht penetrierend	B1p
		B2	strikturierend	B2p
		B3	penetrierend	B3p
				Oberer Gastrointestinaltrakt *
L	Lokalisation	L1	Terminales Ileum	L1 + L4
		L2	Kolon	L2 + L4
		L3	Ileokolon	L3 + L4
		L4	Oberer Gastrointestinaltrakt	L4

Berücksichtigung der Krankheitsdynamik durch die endgültige Eingruppierung erst nach Ablauf einer bestimmten Krankheitsdauer *

Tabelle 37: Montreal-Klassifikation (* Änderung gegenüber der Vienna-Klassifikation, siehe Tabelle 14) ²²⁶

4.2.2 Ersterkrankungsalter

Konträr zu den Resultaten dieser Untersuchung konnten in einigen der anderen Studien zum Thema keine besonderen Krankheitsmerkmale einem der TLR4-Polymorphismen zugeordnet werden. Ursächlich dafür ist vermutlich der geringe Anteil der Polymorphismus-tragenden Morbus Crohn-Patienten, der meist unter 20% lag und daher eine detaillierte Phänotyp-Analyse kritisch bedacht werden muss. Die niederländischen Arbeitsgruppen um Ouburg und Oostenbrug, die ungarischen Untersuchung von Lakatos et al. sowie Arnotts schottische Studie ermittelten andere mit TLR4-Polymorphismen assoziierte Manifestationscharakteristika. ^{15, 123, 171, 175}

Die Resultate von Oostenbrug et. al. wie auch von Lakatos et al. ergaben eine Korrelation zum Ersterkrankungsalter. Die Koexistenz von Asp299Gly und NOD2-Mutationen senkte im ungarischen Crohn-Kollektiv das Erstmanifestationsalter signifikant von 30,2 Jahren in der TLR4-/NOD2- -Subgruppe auf 23 Jahre. Das alleinige Vorkommen der Asp299Gly-Variante führte auch schon zu einer Reduktion des Parameters, allerdings weniger deutlich als bei Patienten mit isolierter NOD2-Mutation (27,4 Jahre versus 26,7 Jahre). Im Gegensatz dazu berichten Oostenbrug et al. von einer signifikant erhöhten Asp299Gly-Trägerfrequenz in der Subgruppe A2 mit Erstdiagnose nach dem 40. Lebensjahr. Die aus der Großhaderner Kohorte gewonnenen Daten stimmen mit den beiden erörterten Studien weitgehend überein. Das Durchschnittsalter bei der Erstdiagnose beträgt im eigenen Kollektiv für das mutierte Asp299Gly-Allel 26,0 Jahre und ist somit um 1,8 Jahre Differenz gegenüber dem Wildtyp (27,8 Jahre) reduziert. Ähnlich verhält sich die Datenlage für den Thr399Ile-SNP. Dabei steht das durchschnittliche Erkrankungsalter von 26,1 Jahren der Isoleucin-Polymorphismusträgern den 27,8 Jahren in der Wildtypgruppe gegenüber. Bei additiver Berücksichtigung des

NOD2-Status bestätigt sich dieser Trend zur genotypabhängigen Reduktion des Erstdiagnosealters. Jedoch hat TLR4 gegenüber den NOD2-Mutationen im eigenen Kollektiv einen stärkeren Effekt. Interessanterweise verändert sich dabei die Relation der Vienna-Kategorie A gegenläufig. Das A2-Maximum mit 20,0% ist in der genetisch mit beiden belasteten Gruppe TLR4+/NOD2+ (Tabelle 38).

Analyse des Erstdiagnosealters				
Genotyp	Durchschnittliches Erstdiagnosealter in Jahren	Durchschnittliches Erstdiagnosealter in Jahren	Prozentualer A1-Anteil	Prozentualer A2-Anteil
	Oostenbrug	Großhaderner Crohn-Kohorte		
TLR4-/NOD2-	30,2	28,1	87,0	13,0
TLR4-/NOD2+	26,7	27,4	86,6	13,4
TLR4+/NOD2-	27,4	26,6	84,2	15,8
TLR4+/NOD2+	23,0	24,9	80,0	20,0

Tabelle 38: Gegenläufigkeit des durchschnittlichen Erstdiagnosealters und der Vienna-Kategorie A

Die isolierte Betrachtung des TLR4-Genotyps zeigt bei den Polymorphismusträgern in der Gegenüberstellung mit den Patienten mit der Normvariante ebenfalls einen tendenziell erhöhten A2-Anteil auf. Bei 17,2% bzw. 16,7% mit Glycin- / Isoleucin-Allel erfolgte die Erstdiagnose nach dem 40. Lebensjahr. Für beide SNPs ist dieses Ergebnis allerdings nicht statistisch signifikant ($P = 0,351$ für Asp299Gly; $P = 0,573$ für Thr399Ile). Auch die anderen hier erwähnten Auffälligkeiten erreichen, konträr zu den Arbeitsgruppen Lakatos und Oostenbrug, in der eigenen Studie das Signifikanzniveau nicht.^{123, 171} Der weitaus überwiegende A1-Anteil erklärt die Ansiedelung des durchschnittlichen Erstdiagnosealters in einem Bereich zwischen 23,0 und 30,2 Jahren. Der Gegenläufigkeit der Resultate liegt aber vermutlich eine andere Ursache zu Grunde. Zum einen könnte dies unter Umständen ein statistisches Artefakt durch zu kleine Kohorten sein, zum anderen aber wäre die Existenz weiterer modifizierender Komponenten möglich. Diese könnten zum Beispiel in ihrer Anwesenheit protektiv und bei Absenz beschleunigend wirken. Demzufolge würde sich dieser Sachverhalt in das Bild einer multifaktoriellen Pathogenese einfügen.

4.2.3 Befallsmuster

Ouburg et al. stellten in den Niederlanden an 112 Crohn-Patienten bei den Trägern des mutierten Asp299Gly-Allels ein signifikant erhöhtes Risiko eines Kolonbefalls fest.¹⁷⁵ So hatten 43% der Patienten mit Kolonbefall die Aminosäuresubstitution gegenüber einem Allelträger-Anteil von nur 12% in der Subgruppe ohne Manifestation am Dickdarm. Überdies hat der einzige Morbus Crohn-Patient mit Asp299Gly-Polymorphismus aus Figueroas

chilenischer Kohorte einen B1-Kolonbefall mit perianaler Beteiligung.⁷⁰ Bei der eigenen Studienkohorte konnte kein vergleichbares TLR4-Befallsmuster beobachtet werden. 17,1% der Patienten mit einem Wildtyp-Status weisen eine L2-Lokalisation auf und stehen dabei 13,8% in der Gruppe der Heterozygoten gegenüber (Tabelle 26). In den anderen Untersuchungen, die eine Phänotypanalyse einschließen, konnte kein Zusammenhang zu einem bestimmten Lokalisationsmuster hergestellt werden.^{15, 74, 123, 171, 247} In der niederländischen Studie wurde die Einteilung der Phänotypen auch gemäß der Vienna-Klassifikation vorgenommen. Es bleibt jedoch die Frage offen, welche Lokalisationsentitäten bei der Untersuchung des Kolonbefalls miteinbezogen wurden. Neben der L2-Subgruppe mit einer alleinigen Dickdarm-Manifestation ist ein Kolonbefall noch in L3 sicher mitenthalten, aber auch in L4 neben des Auftretens im oberen Gastrointestinaltraktes möglich. Aus der Publikation der Ouburger Arbeitsgruppe geht aber nicht hervor, ob das Resultat rein auf der Vienna-Klassifikation basiert oder ob zusätzliche Daten bezüglich der Befallslokalisierung dokumentiert wurden. Die Ergebnisinkonsistenz zwischen den unterschiedlichen Kohorten könnte somit auf einer anderen Methodik basieren. Für Thr399Ile konnte in keiner der bislang durchgeführten Untersuchungen ein Zusammenhang zu einem bestimmten Lokalisationsmuster ermittelt werden.

Zusätzlich fällt bei der kombinierten Genotyp-Analyse in der Münchner Studienkohorte ein signifikant gehäufter Befall des terminalen Ileums und des oberen Gastrointestinaltraktes in der TLR4-/NOD2+ -Gruppe auf ($P = 0,030$ für L1 und $P = 0,0339$ für L4 versus TLR4-/NOD2-). Die Gegenüberstellung mit der reziproken Teilkohorte erbrachte keinen relevanten Unterschied. Beim Vergleich der Mutationsträger mit den Patienten mit unauffälligem Genstatus liegen jedoch ebenso Trends für das vermehrte Vorkommen von L1 bzw. L4 vor. Dieser Befund weist auf eine positive Assoziation zwischen NOD2-Mutationen mit einer Crohnmanifestation im terminalen Ileum hin, wie es diverse Studien konstatieren.^{4, 15, 80, 123, 162} Da die isolierten TLR4-Analysen keine Verbindung zu irgendeinem Befallsmuster herstellen konnte bzw. die Differenz zur reziproken Subgruppe in der TLR4/NOD2-Betrachtung von unbedeutender Größe war, kann nicht mit Sicherheit von einem protektivem Effekt der TLR4-Polymorphismen ausgegangen werden. Zusammenfassend sind die Resultate bezüglich des Befallsmusters, wie bei den anderen erörterten Studien zu diesem Themenkomplex, eher nicht als TLR4-Assoziation zu werten.

4.2.4 Extraintestinale Manifestationen

Interessanterweise konnte Arnotts Arbeitsgruppe zwar keine Beziehung zwischen der Asp299Gly-Frequenz und dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen herstellen, jedoch lieferte die Phänotypanalyse eine schwache positive Assoziation zu entzündlichen Augenerkrankungen.¹⁵ Die Großhaderner Studienkohorte kann dieses Resultat allerdings nicht bestätigen. Die Fälle mit einer Augenbeteiligung hatten zu 100% einen TLR4-negativen Genotyp. Zwölf von den insgesamt 16 Augenbeteiligungen gehörten der TLR4-/NOD2- - Subgruppe an. Die restlichen vier hatten einen TLR4-/NOD2+ -Genstatus. Die Differenzen zwischen TLR4-/NOD2- und den restlichen drei Subentitäten waren mit einem P-Wert von 0,073 nicht statistisch signifikant und würden eher auf einen zu Arnott konträren Zusammenhang hinweisen. Die Prävalenz der entzündlichen Augenerkrankungen war dabei im untersuchten Kollektiv mit 7,8% höher als in anderen Studien, in denen das Vorkommen in einem Bereich von 4-6% geschätzt wird.¹¹¹ Auch keine der anderen untersuchten Begleiterkrankungen und Manifestationen außerhalb des Gastrointestinaltraktes konnte mit dem TLR4-Genotyp verknüpft werden. Gelenkbeteiligungen traten dabei bei den Münchner Patienten sogar häufiger auf als in anderen Kollektiven (41,2% versus 10-35%). Die Prävalenz für den Befall der Gelenke war in der TLR4-/NOD2- Gruppe gegenüber der TLR4-/NOD2+ - Subentität signifikant erhöht (P = 0,039), was einen gelenkprotektiven Effekt des Morbus Crohn-Gens NOD2 suggeriert. Die primär sklerosierende Cholangitis kam nur in einem einzigen Fall vor, was einen prozentualen Anteil von 0,5% ausmacht und damit die 2,5-7,5% anderer Untersuchungen unterschreitet. Ein Zusammenhang dieser Gallenerkrankung ist somit kaum beurteilbar. Die geringe Fallzahl an Patienten mit primär sklerosierender Cholangitis in der untersuchten Kohorte hat ihren Ursprung am ehesten in der in Großhadern vorhandenen Spezialambulanz für diese Erkrankung, deren Patienten nicht automatisch in der Ambulanz für chronisch entzündliche Darmerkrankungen mittherapiert werden. Die Frequenzen der anderen extraintestinalen Erkrankungen - Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum - lagen mit 11,8 bzw. 1,0% im Referenzbereich (6-15% bzw. 0,1-1,2%).¹¹¹ Insgesamt betrachtet, ist die Analyse der extraintestinalen Beschwerden auf Grund der z.T. geringen Fallzahlen mit Vorbehalt zu betrachten. In den anderen erörterten Studien zum TLR- Morbus Crohn-Komplex finden sich keinerlei Anhaltspunkte für eine TLR4-Assoziation mit extraintestinalen Begleiterscheinungen.^{70, 74, 123, 171, 175}

4.2.5 Gene und ihre Phänotypen und der potentielle TLR4-Phänotyp

Zusammenfassend betrachtet, könnte eine Multizenterstudie unter zeitgleichem Einbezug weiterer genetischen Varianten hilfreich sein, die Resultate der Untersuchung hier zu bestätigen und möglicherweise, ähnlich wie für NOD2, einen spezifischen TLR4-Phänotyp sicherer zu identifizieren. Der NOD2-Morbus Crohn-Patient hat gemäß der aktuellen Literatur typischerweise einen strikturierenden Krankheitsverlauf, der frühzeitig exazerbiert und meist einen Ileum- und seltener einen Kolonbefall aufweist.^{4, 15, 80, 123, 162} Zudem ist die Notwendigkeit an Morbus Crohn-bedingten Operationen erhöht.¹²³ Der Zusammenhang zu einem fistulierendem Verlauf wird kontrovers diskutiert. So beschreibt einerseits Ahmad einen protektiven Effekt der NOD2-Mutationen, insbesondere von Leu3020insC, gegenüber einem penetrierendem Verlauf.⁴ Andererseits wird in anderen Studien eine positive Assoziation zu Fisteln konstatiert.^{15, 220} IBD5 mit dem SLC22A4/A5-Kandidatengen, welche die organischen Kationentransporter OCTN1 und OCTN2 kodieren, wurde mit einem frühzeitig entstehendem, perianalen sowie ilealen Morbus Crohn verknüpft.^{14, 115, 196} Außerdem trat der OCTN-TC Haplotyp in einer deutschen Studie ausschließlich bei Morbus Crohn-Patienten mit Kolonbeteiligung auf.²⁴⁶ Das neu entdeckte ATG16L1-Gen bedingt ein 2,2-fach erhöhtes Risiko für einen Befall des Ileums.¹⁸⁷

Ein TLR4-Morbus Crohn-Patient ließe sich dann womöglich kongruent dazu mit einem stenotischen Verlauf und häufigerem Kolonbefall skizzieren. Ob die untersuchten Polymorphismen Auswirkungen auf den Krankheitsbeginn haben und ob sie bei der Entwicklung autoimmunologisch bedingter Augenentzündungen eine Rolle spielt, bleibt nach aktueller Studienlage weitgehend offen.

4.3 Funktionelle Konsequenzen der TLR4-Polymorphismen

Neben der Durchführung von Multizenterstudien zur Klärung der potentiellen Assoziationen ist es durchaus sinnvoll, die funktionellen Konsequenzen der TLR4-Polymorphismen auf biochemischer Ebene zu diskutieren. Die Frage nach den detaillierten involvierten Wirkungsmechanismen ist nämlich noch offen. Zwar liefern verschiedene klinische Studien Anhaltspunkte für die funktionelle Bedeutung der TLR4-Variante Asp299Gly, aber die Effekte und der exakte Mechanismus werden mittlerweile kontrovers erörtert. So demonstrierten einige Mausmodelle inflammatorische Auswirkungen der genetischen TLR4-Signalkaskaden-Dysfunktion und veranlassten somit zahlreiche krankheitsassoziierte TLR4-Studien.^{78, 102, 112, 186}

Für Krankheiten wie Atherosklerose, rheumatoide Arthritis und Diabetes mellitus wurden die endogenen Moleküle HSP60, Fibrinogen, Fibronectin und Hyaluronoligosaccharide verdächtig, über die TLR4-Signalkaskade inflammatorische Reaktionen zu induzieren.^{113, 249} In einer

deutschen Untersuchung wurde eine LPS-Hyporesponsivität bei Monozyten homozygoter Asp299Gly- und Thr399Ile-Träger ermittelt.²¹⁵ Arbour et al. stellten bei der LPS-Inhalation Asp299Gly-abhängige Unterschiede in der Zytokinausschüttung mononukleärer Zellen fest.¹³ Bei der weiteren Untersuchung dieses Zusammenhangs am Mausmodell, zeigte sich, dass zwar bestimmte TLR4-Mutationen mit einer Veränderung des LPS-Reaktionstypus einhergehen, aber offensichtlich auch zusätzliche Gene involviert sind.¹⁴⁰ In der Versuchsreihe von Van der Graaf mit diversen exogenen und endogenen TLR4-Liganden, konnte kein Einfluss der Asp299Gly-Präsenz auf die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine (TNF- α und IL-10) sanguiner mononukleärer Zellen demonstriert werden. In dem einzigen Fall von Homozygotie war die Zytokinproduktion nicht nur nicht defekt, sondern hinsichtlich TNF- α sogar höher.²⁴⁹ Bei der Belastung mononukleärer Zellen unterschiedlichen TLR4-Genotyps mit mehreren verschiedenen LPS-Arten konnten Erridge et al. ebensowenig eine Veränderung der IL-1 β -Produktion beobachten.⁶⁵ Darüberhinaus erzielten mittlerweile auch andere Studien ähnliche Resultate.^{95, 254} In der großen Untersuchung von De Jager et al., die die TLR-Signalkaskade detaillierter betrachtet, wurde deswegen sogar die Möglichkeit diskutiert, dass Asp299Gly nur sehr hoch mit dem eigentlichen genetischen Risikofaktor korreliert ist. Beispielhaft wurde die auch bei De Jager et al. hohe Koprävalenz zwischen den nicht synonymen Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile angeführt.⁵⁰ In dieser Studie wurde aber auch zu bedenken gegeben, dass die TLR4-Signalkaskade, nicht nur in der Aktivierung von NF- κ B resultiert, sondern zusätzlich die STAT- und die IRF-Proteine beeinflusst. Abbildung 6 (S.19) verdeutlicht diese hier angesprochene komplexe Vernetzung der TLR-Signaltransduktion. Definitive Aussagen über die funktionelle Auswirkung der TLR4-Mutationen können, genauso wie hinsichtlich des TLR4-Morbus Crohn-Komplexes, demzufolge noch nicht gemacht werden, weswegen auch keine konkreten Schlussfolgerungen zu Veränderungen der TLR4-Signalkaskade bei Morbus Crohn oder auch anderen Erkrankungen gezogen werden können.

5 Zusammenfassung

Die kausalen Mechanismen des Morbus Crohn sind ungeachtet der schon länger zurückliegenden Erstbeschreibung nur unvollständig geklärt. In der aktuellen Literatur wird von einer multifaktoriellen Pathogenese ausgegangen, bei der die Interaktion genetischer, immunologischer und exogener Faktoren eine Rolle spielt. Der LPS-Rezeptor TLR4 mit seinen vielen Parallelen zum ersten beschriebenen Morbus Crohn-Gen NOD2 stellt einen interessanten Knotenpunkt für diese Aspekte dar. Überdies räumen einige Mausmodelle diesem Rezeptor zur Erkennung von Pathogenmustern (PAMP) eine Bedeutung ein. Die TLR4-Hochregulation in intestinalen Epithelzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen untermauert ebenso wie die Assoziation der am weitesten verbreiteten TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile mit diversen Erkrankungen aus den infektiologischen und immunologischen Komplexen diesen Verdacht. In dieser Studie wurde die genomische DNA von 204 Patienten mit Morbus Crohn und 199 nicht-verwandten Kontrollen mit Hilfe eines Restriktionsendonukleasenverdau auf die Präsenz der beiden häufigsten und in Aminosäuresubstitution resultierenden TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile analysiert. Zusätzlich wurde der NOD2-Status der drei häufigsten Mutationen Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC miteinbezogen. Die Frequenzen der unterschiedlichen Genotypen wurden miteinander verglichen und zur Durchführung einer detaillierten Genotyp-Phänotyp-Analyse verwendet. Zwischen Asp299Gly und Thr399Ile besteht ein großes Kopplungsungleichgewicht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde ein nahezu zweifacher Anstieg der Asp299Gly-Frequenz in der Morbus Crohn-Kohorte beobachtet. Die Prävalenz des strikturierenden Phänotyps war unter den für mindestens einen der TLR4-Polymorphismen heterozygoten Patienten gegenüber den Wildtyp-Trägern erhöht. Der Genotyp Asp299Gly+/NOD2- war ein besonders starker Risikofaktor für einen strikturierenden Krankheitsverlauf. Konträr dazu bestand ein Trend zur Prävalenz des penetrierenden Phänotyps in der Gruppe mit dem reziproken Genotyp Asp299Gly-/NOD2+. Die TLR4-Variante Asp299Gly stellt demzufolge einen Risikofaktor für Morbus Crohn dar. TLR4 und NOD2 könnten für die Ausprägung unterschiedlicher Phänotypen verantwortlich sein. Vor wenigen Monaten wurde - den Resultaten dieser Studie entsprechend - TLR4 als Suszeptibilitätsgen in einer sehr großen Metaanalyse bestätigt.

6 Literaturverzeichnis

1. Abercrombie J. Pathological and practical researches of the stomach, the intestinal tract, and other viscera. Waugh and Innes zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84., 1828.
2. Adam R, Sturrock RD, Gracie JA. TLR4 mutations (Asp299Gly and Thr399Ile) are not associated with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1099-101.
3. Agnese DM, Calvano JE, Hahm SJ, et al. Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections. *J Infect Dis* 2002;186:1522-5.
4. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854-66.
5. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, et al. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:731-48.
6. Ahrens P, Kattner E, Kohler B, et al. Mutations of genes involved in the innate immune system as predictors of sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res* 2004;55:652-6.
7. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
8. Akman IO, Ostrov BE, Neudorf S. Autoimmune manifestations of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:218-25.
9. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, et al. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.
10. Ameziane N, Beillat T, Verpillat P, et al. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:e61-4.
11. Anderson KV. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 2000;12:13-9.
12. Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 1985;42:791-8.
13. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000;25:187-91.
14. Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, et al. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* 2003;52:1133-9.
15. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, et al. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun* 2004;5:417-25.
16. Assmann SF, Pocock SJ, Enos LE, et al. Subgroup analysis and other (mis)uses of baseline data in clinical trials. *Lancet* 2000;355:1064-9.
17. Balistreri CR, Candore G, Colonna-Romano G, et al. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *Jama* 2004;292:2339-40 zitiert in De Staercke C, Lally C, Austin H, et al. The lack of association between four point mutations in the promoter region of the toll-like 4 receptor gene and myocardial infarction. *Thromb Res* 2007;119:105-10.
18. Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:436-41.
19. Baumgart DC, Sandborn WJ. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet* 2007;369:1641-57.
20. Baur MJ. Population analysis of HLA-A, B, C, DR, and other genetic markers. In: Terasaki P, ed. *Histocompatibility Testing 1980*. Volume UCLA Press. Los Angeles, 1980:955-958.
21. Belvin MP, Anderson KV. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:393-416.
22. Bernasconi P, Barberis M, Baggi F, et al. Increased toll-like receptor 4 expression in thymus of myasthenic patients with thymitis and thymic involution. *Am J Pathol* 2005;167:129-39.
23. Beutler B, Beutler E. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:1978-80; author reply 1978-80.
24. Birrenbach T, Bocker U. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:848-59.
25. Boekholdt SM, Agema WR, Peters RJ, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003;107:2416-21.
26. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:521-36.
27. Braat H, Dijkgraaf M, Curvers W, et al. A functional Single Nucleotide Polymorphism of the Tlr4 gene is correlated with Crohn's Disease but not with Ulcerative Colitis, In *ddw03*, 2003.

28. Braat H, Stokkers P, Hommes T, et al. Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients. *J Mol Med* 2005;83:601-9.
29. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, et al. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:645-52.
30. Brandes JW, Lorenz-Meyer H. [Epidemiologic aspects of Crohn regional enterocolitis and ulcerative colitis in Marburg/Lahn (West Germany) between 1962 and 1975]. *Z Gastroenterol* 1983;21:69-78 zitiert in Hoffmann J., Kroesen A., Klump B. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen - Das CED-Handbuch für Klinik und Praxis*, Stuttgart, 2004, Georg Thieme Verlag.
31. Brant SR, Shugart YY. Inflammatory bowel disease gene hunting by linkage analysis: rationale, methodology, and present status of the field. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:300-11.
32. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, et al. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1013-21.
33. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1989;34:1841-54.
34. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 2005;54:1182-93.
35. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7.
36. Chen Y-CG, Edward; Lazarus, Ross; Kraft, Peter; Ketkar, Shamika; Hunter, David J. Sequence variants of Toll-like Receptor 4 and susceptibility to prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:11771-11778.
37. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, et al. Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:7502-7.
38. Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, et al. Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* 2000;9:1425-32.
39. Colles A. Practical observations upon certain diseases of intestines, colon and rectum. *Dublin Hosp Reports* 1830:131 zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84.
40. Combe C, Saunders, H.,. A singular case of stricture and thickening of ileum. *MedTransof Roy Coll Physicians London* 1813:16 zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84.
41. Compton RF, Sandborn WJ, Yang H, et al. A new syndrome of Crohn's disease and pachydermoperiostosis in a family. *Gastroenterology* 1997;112:241-9.
42. Cooke GS, Segal S, Hill AV. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:1978-80; author reply 1978-80.
43. Cosnes J, Cattan S, Blain A, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:244-50.
44. Crohn B, Ginzburg, L., Oppenheimer, GD. Regional enteritis: A pathological and clinical entity. *Jama* 1932:1323 - 1329.
45. Cummings JR, Jewell DP. Clinical implications of inflammatory bowel disease genetics on phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:56-61.
46. Curran ME, Lau KF, Hampe J, et al. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 1998;115:1066-71.
47. Daiss W, Scheurlen M, Malchow H. Epidemiology of inflammatory bowel disease in the county of Tübingen (West Germany). *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;170:39-43; discussion 50-5.
48. Dalziel T. Chronic interstitial enteritis. *Br. Med.* 1913;3:1068-1070 zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84.
49. Danese S, Sans M, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmun Rev* 2004;3:394-400.
50. De Jager PL, Franchimont D, Waliszewska A, et al. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 2007.
51. De Staercke C, Lally C, Austin H, et al. The lack of association between four point mutations in the promoter region of the toll-like 4 receptor gene and myocardial infarction. *Thromb Res* 2007;119:105-10.
52. de Vlam K, Mielants H, Cuvelier C, et al. Spondyloarthritis is underestimated in inflammatory bowel disease: prevalence and HLA association. *J Rheumatol* 2000;27:2860-5.

53. Dechert U. Gelelektrophoresen. In: Schrimpf G, ed. Gentechnische Methoden. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002:39-88.
54. Demetter P, Baeten D, De Keyser F, et al. Subclinical gut inflammation in spondyloarthritis patients is associated with upregulation of the E-cadherin/catenin complex. *Ann Rheum Dis* 2000;59:211-6.
55. Demetter P, De Vos M, Van Damme N, et al. Focal up-regulation of E-cadherin-catenin complex in inflamed bowel mucosa but reduced expression in ulcer-associated cell lineage. *Am J Clin Pathol* 2000;114:364-70.
56. Dörner K. *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme, 2001.
57. Duerr RH. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002;31:63-76.
58. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* 1998;63:95-100.
59. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, et al. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* 2000;66:1857-62.
60. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006;314:1461-3.
61. Dunne A, O'Neill LA. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 2005;579:3330-5.
62. Edfeldt K, Bennet AM, Eriksson P, et al. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2004;25:1447-53.
63. Ekbohm A, Helmick C, Zack M, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991;100:350-8.
64. Elitsur Y, Lawrence Z, Tolaymat N. The Diagnostic Accuracy of Serologic Markers in Children With IBD: The West Virginia Experience. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:670-673.
65. Erridge C, Stewart J, Poxton IR. Monocytes heterozygous for the Asp299Gly and Thr399Ile mutations in the Toll-like receptor 4 gene show no deficit in lipopolysaccharide signalling. *J Exp Med* 2003;197:1787-91.
66. Fabry W. Ex scirrho et ulcere cancioso in intestino cocco exorta iliaca passio. Opera, observation LXI, Centuriael. Frankfurt:31 J.L. Dufour (1682) :49 zitiert in Fielding JF. Crohn's disease and Dalziel's syndrome. A history. *J Clin Gastroenterol* 1988;10:279-85 zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84. 1682.
67. Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, et al. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:627-34.
68. Ferrand PE, Fujimoto T, Chennathukuzhi V, et al. The CARD15 2936insC mutation and TLR4 896 A>G polymorphism in African Americans and risk of preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Mol Hum Reprod* 2002;8:1031-4.
69. Fielding JF. Crohn's disease and Dalziel's syndrome. A history. *J Clin Gastroenterol* 1988;10:279-85 zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84.
70. Figueroa C, Peralta A, Herrera L, et al. NOD2/CARD15 and Toll-like 4 receptor gene polymorphism in Chilean patients with inflammatory bowel disease. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:125-30.
71. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
72. Folwaczny C, Glas J, Torok HP. Crohn's disease: an immunodeficiency? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:621-6.
73. Folwaczny C, Ruelfs C, Walther J, et al. Ulcerative colitis in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Endoscopy* 2002;34:840-1.
74. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, et al. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 2004;53:987-92.
75. Friend DR. Review article: issues in oral administration of locally acting glucocorticosteroids for treatment of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1998;12:591-603.
76. Fries W, Renda MC, Lo Presti MA, et al. Intestinal permeability and genetic determinants in patients, first-degree relatives, and controls in a high-incidence area of Crohn's disease in Southern Italy. *Am J Gastroenterol* 2005;100:2730-6.
77. Fruman DA, Burakoff SJ, Bierer BE. Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *Faseb J* 1994;8:391-400.

78. Fukata M, Michelsen KS, Eri R, et al. Toll-like receptor-4 is required for intestinal response to epithelial injury and limiting bacterial translocation in a murine model of acute colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;288:G1055-65.
79. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:8-15.
80. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005;11:681-5.
81. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, et al. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;116:152-6.
82. Gergely P, Jr., Blazsek A, Weiszhar Z, et al. Lack of genetic association of the Toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with spondylarthropathies in a Hungarian population. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1194-6.
83. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, et al. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003;278:8869-72.
84. Goebell H, Dirks, E., Förster, S., Strey, B., Quebe-Fehling, E. A prospective study of the incidence and prevalence of Crohn's disease in an urban population in Germany. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994;6:1039 - 45.
85. Greenstein AJ, Janowitz HD, Sachar DB. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: a study of 700 patients. *Medicine (Baltimore)* 1976;55:401-12.
86. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002;277:41701-5.
87. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-8.
88. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007;39:207-11.
89. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, et al. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-16.
90. Hampe J, Shaw SH, Saiz R, et al. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999;65:1647-55.
91. Hang J, Zhou W, Zhang H, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms are very rare in the Chinese population. *J Endotoxin Res* 2004;10:238-40.
92. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005;174:2942-50.
93. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-103.
94. Hayward PA, Satsangi J, Jewell DP. Inflammatory bowel disease and the X chromosome. *Qjm* 1996;89:713-8.
95. Heesen M, Bloemeke B, Kunz D. The cytokine synthesis by heterozygous carriers of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism does not differ from that of wild type homozygotes. *Eur Cytokine Netw* 2003;14:234-7.
96. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.
97. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.
98. Hermiston ML, Gordon JI. *In vivo* analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1995;129:489-506.
99. Hermiston ML, Gordon JI. Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin. *Science* 1995;270:1203-7.
100. Hirschfeld AF, Jiang R, Robinson WP, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and idiopathic chromosomally normal miscarriage. *Hum Reprod* 2006.
101. Holloway JW, Yang IA, Ye S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:15-21.
102. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999;162:3749-52.

103. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
104. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-3.
105. Hugot JP, Zouali H, Lesage S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:593-7.
106. Illig T, Bongardt F, Schopfer A, et al. The endotoxin receptor TLR4 polymorphism is not associated with diabetes or components of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2003;52:2861-4.
107. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, et al. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003;278:5509-12.
108. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, et al. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:86-91.
109. Isaacs KL, Lewis JD, Sandborn WJ, et al. State of the Art: IBD Therapy and Clinical Trials in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11 Suppl 1:S3-S12.
110. Joos S, Rosemann T, Szecsenyi J, et al. Use of complementary and alternative medicine in Germany - a survey of patients with inflammatory bowel disease. *BMC Complement Altern Med* 2006;6:19.
111. Juillerat P, Mottet C, Froehlich F, et al. Extraintestinal manifestations of Crohn's disease. *Digestion* 2005;71:31-6.
112. Kaisho T, Akira S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* 2001;22:78-83.
113. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002;347:185-92.
114. Kinane DF, Shiba H, Stathopoulou PG, et al. Gingival epithelial cells heterozygous for Toll-like receptor 4 polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile are hypo-responsive to *Porphyromonas gingivalis*. *Genes Immun* 2006;7:190-200.
115. Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, et al. Genotype and phenotype relation in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005;40 Suppl 16:21-4.
116. Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84.
117. Kirsner JB, Spencer JA. Family Occurrences of Ulcerative Colitis, Regional Enteritis, and Ileocolitis. *Ann Intern Med* 1963;59:133-44 zitiert in Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, et al. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:731-48.
118. Kohler JA, Grant DB. Crohn's disease in Turner's syndrome. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;282:950.
119. Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J* 2004;148:1034-40.
120. Krisp A, Hoffman R, Happle R, et al. Hermansky-Pudlak syndrome. *Eur J Dermatol* 2001;11:372-3.
121. Kyle J. Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review. *Gastroenterology* 1992;103:392-9.
122. Kyle J, Stark G. Fall in the incidence of Crohn's disease. *Gut* 1980;21:340-3.
123. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, et al. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. *World J Gastroenterol* 2005;11:1489-95.
124. Lamb RM, Zeggini E, B MA, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2004.
125. Lapidus A. The changing epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 2001;64:155-9.
126. Lapidus A, Bernell O, Hellers G, et al. Incidence of Crohn's disease in Stockholm County 1955-1989. *Gut* 1997;41:480-6.
127. Lee FI, Costello FT. Crohn's disease in Blackpool--incidence and prevalence 1968-80. *Gut* 1985;26:274-8.
128. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, et al. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.
129. Lemann M, Zenjari T, Bouhnik Y, et al. Methotrexate in Crohn's disease: long-term efficacy and toxicity. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1730-4.

130. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-57.
131. Libioulle C, Louis E, Hansoul S, et al. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet* 2007;3:e58.
132. Lindberg E, Jornerot G. The incidence of Crohn's disease is not decreasing in Sweden. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:495-500.
133. Lindsten J. Nobel Lectures in Physiology or Medicine, 1971-1980. Singapur: World Scientific Pub Co Inc, 1993:690.
134. Lockhart-Mummery HE, Morson BC. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1960;1:87-105 zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84.
135. Loffler A, Glados M. [Data on the epidemiology of Crohn disease in the city of Cologne]. *Med Klin (Munich)* 1993;88:516-9.
136. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, Prevalence, and Environmental influences. *Gastroenterology* 2004;1504-1517.
137. Logan RF. Inflammatory bowel disease incidence: up, down or unchanged? *Gut* 1998;42:309-11.
138. Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR. *Biotechniques* 2001;31:22-4.
139. Lorenz E, Hallman M, Marttila R, et al. Association between the Asp299Gly polymorphisms in the Toll-like receptor 4 and premature births in the Finnish population. *Pediatr Res* 2002;52:373-6.
140. Lorenz E, Jones M, Wohlford-Lenane C, et al. Genes other than TLR4 are involved in the response to inhaled LPS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L1106-14.
141. Lorenz E, Mira JP, Frees KL, et al. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002;162:1028-32.
142. Lorenz E, Schwartz DA, Martin PJ, et al. Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:384-7.
143. Louis E, Collard A, Oger AF, et al. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001;49:777-82.
144. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:5598-603.
145. Ma Y, Ohmen JD, Li Z, et al. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:271-8.
146. Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet* 2004;13 Spec No 1:R161-8.
147. McDonald JW, Feagan BG, Jewell D, et al. Cyclosporine for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD000297.
148. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343:338-44.
149. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
150. Mockenhaupt FP, Cramer JP, Hamann L, et al. Toll-like receptor (TLR) polymorphisms in African children: Common TLR-4 variants predispose to severe malaria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:177-82.
151. Monsen U, Bernell O, Johansson C, et al. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:302-6.
152. Montanelli A, Mainardi E, Vagni A, et al. Immunological markers anti-saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA) and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in inflammatory bowel disease: a helpful diagnostic tool. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2005;51:201-7.
153. Montes AH, Asensi V, Alvarez V, et al. The Toll-like receptor 4 (Asp299Gly) polymorphism is a risk factor for Gram-negative and haematogenous osteomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2006;143:404-13.
154. Morgagni G. "De sedibus et causis morborum per anatomen indigatis"—"On the Seats and Causes of Disease"—(Venice, 1771, trans. French, English, and German) zitiert in Kirsner JB. Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* 2001;7:175-84., 1761.
155. Morre SA, Murillo LS, Bruggeman CA, et al. The role that the functional Asp299Gly polymorphism in the toll-like receptor-4 gene plays in susceptibility to Chlamydia trachomatis-associated tubal infertility. *J Infect Dis* 2003;187:341-2; author reply 342-3.

156. Moschcowitz E WA. Nonspecific granulomata of the intestine. *Am J Med Sci* 1923;166:48-66.
157. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000;164:5998-6004.
158. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, et al. Toll-like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2000;28:563-6.
159. Nakada TA, Hirasawa H, Oda S, et al. Influence of toll-like receptor 4, CD14, tumor necrosis factor, and interleukine-10 gene polymorphisms on clinical outcome in Japanese critically ill patients. *J Surg Res* 2005;129:322-8.
160. Netea MG, Hijmans A, van Wissen S, et al. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest* 2004;34:94-9.
161. Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007;13:26-8.
162. Newman B, Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:401-7.
163. Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1699-708.
164. Noguchi E, Nishimura F, Fukai H, et al. An association study of asthma and total serum immunoglobulin E levels for Toll-like receptor polymorphisms in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 2004;34:177-83.
165. Ochsenkühn TS, Martin. Studientitel: Phase II Studie mit standardisiertem Cannabis-Extrakt bei Patienten mit einem aktiven Morbus Crohn. II. Medizinische Klinik der Ludwig-Maximilians Universität München, Marchioninstr. 15, 81377 München. München: Ludwig-Maximilians Universität München, Studienbeginn 2005.
166. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:603-6.
167. Ogura Y, Inohara N, Benito A, et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001;276:4812-8.
168. Okayama N, Fujimura K, Suehiro Y, et al. Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* 2002;16:56-8.
169. O'Neill LA, Fitzgerald KA, Bowie AG. The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members. *Trends Immunol* 2003;24:286-90.
170. Oostenbrug L, De Jong D., Drenth JPH., et al. Lack of association between toll-like receptor 4 haplotype and Asp299Gly polymorphism and susceptibility for inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2003;124:A372.
171. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, et al. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:567-75.
172. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 2000;13:715-25.
173. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, et al. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075-81.
174. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-8.
175. Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JB, et al. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the *Saccharomyces cerevisiae* mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway. *Gut* 2005;54:439-40.
176. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:13766-71.
177. Pabst S, Baumgarten G, Stremmel A, et al. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2006;143:420-6.
178. Palmer SM, Burch LH, Davis RD, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:628-32.
179. Palmer SM, Burch LH, Mir S, et al. Donor polymorphisms in Toll-like receptor-4 influence the development of rejection after renal transplantation. *Clin Transplant* 2006;20:30-6.
180. Panaccione R, Sandborn WJ. Medical therapy of Crohn disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:351-9.
181. Parkes M, Barnada MM, Satsangi J, et al. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2000;67:1605-10.
182. Pierik M, Vermeire S, El-Housni H, et al. Toll-like receptor (TLR)-4 Asp299Gly polymorphism is associated with ulcerative colitis (UC), In *ddw03*, 2003.

183. Pierik M, Yang H, Barmada MM, et al. The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:1-7.
184. Plosker GL, Lyseng-Williamson KA. Adalimumab: in Crohn's disease. *BioDrugs* 2007;21:125-32.
185. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002;347:417-29.
186. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998;282:2085-8.
187. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, et al. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. *Gastroenterology* 2007;132:1665-71.
188. Qiagen. Handbuch für QIAamp DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits, 2002.
189. Qureshi AI, Cohen RD. Mesalamine delivery systems: do they really make much difference? *Adv Drug Deliv Rev* 2005;57:281-302.
190. Raby BA, Klimecki WT, Laprise C, et al. Polymorphisms in toll-like receptor 4 are not associated with asthma or atopy-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1449-56.
191. Rath HC, Herfarth HH, Ikeda JS, et al. Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats. *J Clin Invest* 1996;98:945-53.
192. Reindl M, Lutterotti A, Ingram J, et al. Mutations in the gene for toll-like receptor 4 and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 2003;61:85-8.
193. Reinisch W. A new European-wide effort to classify IBD phenotypes., In The 12th United European Gastroenterology Week, Prag, Tschechoslowakei, September 25-29, 2004.
194. Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, et al. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005;204:27-42.
195. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, et al. Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 2001;29:223-8.
196. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, et al. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 2000;66:1863-70 zitiert in Kinouchi Y, Negoro K, Takagi S, et al. Genotype and phenotype relation in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2005;40 Suppl 16:21-4.
197. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007;39:596-604.
198. Roe TF, Thomas DW, Gilsanz V, et al. Inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib. *J Pediatr* 1986;109:55-9.
199. Rose-John S, Schooltink H. CDP-870. Celltech/Pfizer. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:588-92.
200. Rudofsky G, Jr., Reismann P, Witte S, et al. Asp299Gly and Thr399Ile genotypes of the TLR4 gene are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:179-83.
201. Russel MG. Changes in the incidence of inflammatory bowel disease: what does it mean? *Eur J Intern Med* 2000;11:191-196.
202. Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, et al. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1997;223:88-91.
203. Rutgeerts PJ. An historical overview of the treatment of Crohn's disease: why do we need biological therapies? *Rev Gastroenterol Disord* 2004;4 Suppl 3:S3-9.
204. Sabroe I, Whyte MK, Wilson AG, et al. Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms and COPD. *Thorax* 2004;59:81.
205. Saiki RK, Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988 Jan 29;239(4839):487-491.
206. Sanchez E, Orozco G, Lopez-Nevot MA, et al. Polymorphisms of toll-like receptor 2 and 4 genes in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2004;63:54-7.
207. Sandberg-Gertzen H, Eid R, Jarnerot G. Hermansky-Pudlak syndrome with colitis and pulmonary fibrosis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1055-6.
208. Sandborn WJ, Targan SR. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:1592-608.

209. Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:44-50.
210. Sartor RB. Review article: How relevant to human inflammatory bowel disease are current animal models of intestinal inflammation? *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11 Suppl 3:89-96; discussion 96-7.
211. Sartor RB. Review article: Role of the enteric microflora in the pathogenesis of intestinal inflammation and arthritis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11 Suppl 3:17-22; discussion 22-3.
212. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620-33.
213. Satsangi J, Parkes M, Louis E, et al. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* 1996;14:199-202.
214. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977;31:107-33.
215. Schmitt C, Humeny A, Becker CM, et al. Polymorphisms of TLR4: rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant alleles. *Clin Chem* 2002;48:1661-7.
216. Schreiber S, Heinig T, Panzer U, et al. Impaired response of activated mononuclear phagocytes to interleukin 4 in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995;108:21-33.
217. Schrimpf G. *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, 2002.
218. Schultz M, Tonkonogy SL, Sellon RK, et al. IL-2-deficient mice raised under germfree conditions develop delayed mild focal intestinal inflammation. *Am J Physiol* 1999;276:G1461-72.
219. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1114-21.
220. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, et al. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006;41:1421-32.
221. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, et al. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224-31.
222. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002;359:62-9.
223. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:809-18.
224. Shim YW, Suh JS. Primary hypertrophic osteoarthropathy accompanied by Crohn's disease: a case report. *Yonsei Med J* 1997;38:319-22.
225. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996;39:690-7.
226. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005;19 Suppl A:5-36.
227. Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, et al. Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 2001;158:1657-64.
228. Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 1991;100:143-9.
229. Stange EF, Schreiber S, Folsch UR, et al. [Diagnostics and treatment of Crohn's disease -- results of an evidence-based consensus conference of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases]. *Z Gastroenterol* 2003;41:19-20.
230. Stockbrugger RW, Russel MG, van Blankenstein M, et al. EC-IBD: a European effort in inflammatory bowel disease. *Eur J Intern Med* 2000;11:187-190.
231. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36:476-80.
232. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., et al. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:87-90.
233. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, et al. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.

234. Szebeni B, Szekeres R, Rusai K, et al. Genetic polymorphisms of CD14, toll-like receptor 4, and caspase-recruitment domain 15 are not associated with necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42:27-31.
235. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:3516-21.
236. Takeda K. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2005;11:51-5.
237. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
238. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999;11:443-51.
239. Tamboli CP, Cortot A, Colombel JF. What are the major arguments in favour of the genetic susceptibility for inflammatory bowel disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:587-92.
240. Tamboli CP, Richard F, Colombel JF. Fecal calprotectin in Crohn's disease: new family ties. *Gastroenterology* 2003;124:1972-4.
241. Teahon K, Webster AD, Price AB, et al. Studies on the enteropathy associated with primary hypogammaglobulinaemia. *Gut* 1994;35:1244-9.
242. Thjodleifsson B, Sigthorsson G, Cariglia N, et al. Subclinical intestinal inflammation: an inherited abnormality in Crohn's disease relatives? *Gastroenterology* 2003;124:1728-37.
243. Thomas GA, Rhodes J, Green JT. Inflammatory bowel disease and smoking--a review. *Am J Gastroenterol* 1998;93:144-9.
244. Timmer A. Environmental influences on inflammatory bowel disease manifestations. Lessons from epidemiology. *Dig Dis* 2003;21:91-104.
245. Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:79-84.
246. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 2005;54:1421-7.
247. Torok HP, Glas J, Tonenchi L, et al. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2004;112:85-91.
248. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, et al. 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* 1988;29:990-6.
249. van der Graaf C, Kullberg BJ, Joosten L, et al. Functional consequences of the Asp299Gly Toll-like receptor-4 polymorphism. *Cytokine* 2005;30:264-8.
250. Van der Graaf CA, Netea MG, Morre SA, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for Candida bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* 2006;17:29-34.
251. van der Paardt M, Crusius JB, de Koning MH, et al. No evidence for involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) A896G and CD14-C260T polymorphisms in susceptibility to ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:235-8.
252. van 't Veer C, Russel M., Van Nieuwenhoven M., et al. The Tlr4 Asp299Gly substitution, protection against ulcerative colitis or a switch to Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:A372.
253. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, et al. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. *Gut* 2004;53:980-6.
254. von Aulock S, Schroder NW, Gueinzius K, et al. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis* 2003;188:938-43.
255. Wang T, Town T, Alexopoulou L, et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 2004;10:1366-73.
256. Washington K, Stenzel TT, Buckley RH, et al. Gastrointestinal pathology in patients with common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinemia. *Am J Surg Pathol* 1996;20:1240-52.
257. Wells C. Ulcerative colitis and Crohn's disease. *Ann R Coll Surg Engl* 1952;11:105-20.
258. Werner M, Topp R, Wimmer K, et al. TLR4 gene variants modify endotoxin effects on asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:323-30.
259. West GA, Matsuura T, Levine AD, et al. Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* 1996;110:1683-95.

260. Wilensky A ME. Nonspecific granulomata of the small intestine. *Am. J. Med. Sci.* 1927;173:374-380.
261. Williams CN, Kocher K, Lander ES, et al. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:375-81.
262. Yang H, Ohmen JD, Ma Y, et al. Additional evidence of linkage between Crohn's disease and a putative locus on chromosome 12. *Genet Med* 1999;1:194-8.
263. Yang IA, Barton SJ, Rorke S, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism and severity of atopy in asthmatics. *Genes Immun* 2004;5:41-5.
264. Yap LM, Ahmad T, Jewell DP. The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:577-96.
265. Zankl H. *Genetik - Von der Vererbungslehre zur Genmedizin*. Beck'sche Reihe. Volume 2094. München: Verlag C.H. Beck, 1998:113.
266. Zarepari S, Buraczynska M, Branham KE, et al. Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet* 2005;14:1449-55.
267. Zee RY, Hegener HH, Gould J, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke* 2005;36:154-7.
268. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303:1522-6.
269. Zheng SL, Augustsson-Balter K, Chang B, et al. Sequence variants of toll-like receptor 4 are associated with prostate cancer risk: results from the CAncer Prostate in Sweden Study. *Cancer Res* 2004;64:2918-22.
270. Zholudev A, Zurakowski D, Young W, et al. Serologic testing with ANCA, ASCA, and anti-OmpC in children and young adults with Crohn's disease and ulcerative colitis: diagnostic value and correlation with disease phenotype. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2235-41.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das europäische Nord-Süd-Gefälle (erstellt nach Shivananda) ²²⁵	5
Abbildung 2: Altersabhängige Geschlechtsverteilung (erstellt nach Shivananda) ²²⁵	8
Abbildung 3: NOD2-Aufbau ¹⁰⁵	12
Abbildung 4: Gegenüberstellung der IL-12-Kaskade mit den IL-23-Kaskaden ¹⁶¹	16
Abbildung 5: Aufbau der humanen TLR und ihre Liganden (erstellt nach Anderson, Takeda, Cario) ^{11, 34, 236}	17
Abbildung 6: TLR-Signalkaskade (modifiziert nach Dunne, Takeda, O`Neill) ^{61, 169, 236}	19
Abbildung 7: Strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen NOD2 und TLR4 ³⁴	21
Abbildung 8: Beeinflussung der Molekülfortbewegung in der Gelelektrophorese (erstellt nach Dechert) ⁵³	30
Abbildung 9: Skizze eines Agarose-Gels.....	31
Abbildung 10: Bandenmuster nach Restriktionsendonukleasenverdau mit NcoI und HinfI	34
Abbildung 11: Verteilung der Phänotypen in der untersuchten Crohn-Studienpopulation	39
Abbildung 12: a) Unterschiede im Krankheitsverlauf b) im Lokalisationsmuster zwischen den Vienna-Erstdiagnosealtersgruppen A1 und A2	40
Abbildung 13: Prävalenz der drei häufigsten NOD2-Mutationen Arg702Trp, Gly908Arg, Leu3020insC in Abhängigkeit des TLR4-Polymorphismus-Status	48
Abbildung 14: Relation der Asp299Gly-Genotyp-Verteilung dieses Studienkollektivs zu anderen Studien	56
Abbildung 15: Graphische Aufarbeitung der verschiedenen Studienergebnisse bezüglich der TLR4-Assoziation zu Morbus Crohn	61

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Historische Aspekte des Morbus Crohn	2
Tabelle 2: Übersicht über die Pharmakotherapie des Morbus Crohn	4
Tabelle 3: Morbus Crohn-Inzidenz in Deutschland pro 100 000 Einwohner pro Jahr	5
Tabelle 4: Untersuchte exogene Faktoren ^{24, 33, 49, 71, 116, 136, 223, 243, 244, 67}	7
Tabelle 5: Geschlechtsverteilung.....	8
Tabelle 6: Argumente für einen genetischen Hintergrund (modifiziert nach Bonen und Ahmad) ²⁶	10
Tabelle 7: Wiederholt reproduzierte CED-Kopplungsregionen ^{26, 115, 162}	11
Tabelle 8: Argumente gegen Infektionshypothese bei der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ²²³	14
Tabelle 9: Argumente für eine Beteiligung der Mikroflora an der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ²²³	15
Tabelle 10: Liganden der humanen Toll-like Rezeptoren (erstellt nach Dunne und Cario) ^{61, 34}	18
Tabelle 11: Protektive Regulation der Toll-Kaskade ⁷	20
Tabelle 12: Gemeinsamkeiten von NOD2 und TLR4 ^{28, 34}	22
Tabelle 13: Demographische Kohorten-Daten	24
Tabelle 14: Vienna-Klassifikation.....	25
Tabelle 15: Definition der Lokalisationsklassifikation	25
Tabelle 16: Definition der Komplikationsklassifikation.....	25
Tabelle 17: Verwendete PCR-Primer	28
Tabelle 18: TLR4-PCR-Ansätze	28
Tabelle 19: Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme	33
Tabelle 20: Versuchsprotokoll pro Ansatz zum Nachweis der Polymorphismen	33
Tabelle 21: Erwartete Bandenmuster	34
Tabelle 22: Häufigkeitsverteilung der TLR4-Genotypen.....	36
Tabelle 23: Kosegregation der beiden TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile.....	37
Tabelle 24: Phänotyphäufigkeiten der Crohn-Studienpopulation entsprechend den 24 Subgruppen der Vienna-Klassifikation.	38
Tabelle 25: Häufigkeit der Vienna-Subgruppen innerhalb der zwei Altersgruppen.....	40
Tabelle 26: Assoziation zwischen dem TLR4-Asp299Gly-Polymorphismus und Morbus Crohn- Charakteristika	42
Tabelle 27: Assoziation zwischen dem TLR4-Thr399Ile-Polymorphismus und Morbus Crohn- Charakteristika	43
Tabelle 28: Genotyp-abhängige Verteilung der Beschwerden außerhalb des Gastrointestinaltraktes in den isolierten Asp299Gly- bzw. Thr399Ile	44
Tabelle 29: Verteilung der Beschwerden außerhalb des Gastrointestinaltraktes in Abhängigkeit vom kombinierten TLR4-Genotyp	45
Tabelle 30: Die Verteilung der drei NOD2 Arg702Trp, Gly908Arg und Leu3020insC in Bezug auf die TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile.	47
Tabelle 31: Assoziation zwischen dem TLR4 Asp299Gly-Polymorphismus, NOD2-Mutationen und Krankheitscharakteristika des Morbus Crohn	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 32: Detaillierte TLR4/NOD2-Phänotyp-Aufschlüsselung der extraintestinalen Manifestationen und nicht-krankheitsspezifischen Komplikationen Osteoporose, Psoriasis und Amyloidose	52
Tabelle 33: Signifikante Assoziation zu den TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und / oder Thr399Ile	54
Tabelle 34: Zusammenfassung der Aussagen zum Kopplungsungleichwicht zwischen Asp299Gly und Thr399Ile in verschiedenen nicht auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen fokussierten Studien.....	58
Tabelle 35: Die Häufigkeit der TLR4-Genotypen in anderen Studien zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	59
Tabelle 36: Weltweites Vorkommen der TLR4-Polymorphismen in nicht-CED-assoziierten Studien bzw. ausschließlich in den Kontrollkollektiven der CED-Studien	62
Tabelle 37: Montreal-Klassifikation ²²⁶	66
Tabelle 38: Gegenläufigkeit des durchschnittlichen Erstdiagnosealters und der Vienna-Kategorie A..	67

9 Abkürzungsverzeichnis

ANCA	<u>A</u> nti- <u>N</u> eutrophilen- <u>c</u> ytoplasmatische <u>A</u> ntikörper
Anti-OmpC	<u>A</u> nti- <u>o</u> uter <u>m</u> embrane of <u>p</u> orin <u>C</u>
ASCA	<u>A</u> nti- <u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae <u>A</u> ntikörper
Asp299Gly	<u>A</u> sparagin 299 <u>G</u> lycin
ATG16L1	<u>a</u> u <u>t</u> ophagy-related 16- <u>l</u> ike 1 gene
CARD	<u>C</u> aspase- <u>a</u> ctivated <u>r</u> ecruitment <u>d</u> omains
CASP	<u>C</u> aspase
CD	<u>C</u> rohn`s <u>d</u> isease
CDx	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation x
CDP	<u>C</u> ytidindiphosphat
CED	<u>C</u> hronisch <u>e</u> ntzündliche <u>D</u> armerkrankungen
CI	<u>C</u> olitis <u>i</u> ndeterminata
CMV	<u>C</u> ytomegalie- <u>V</u> irus
COX2	<u>C</u> yclooxygenase 2
CU	<u>C</u> olitis <u>u</u> lcerosa
dATP	<u>D</u> esoxy <u>a</u> denosin <u>t</u> riphosphat
dCTP	<u>D</u> esoxycytidin <u>t</u> riphosphat
dGTP	<u>D</u> esoxyguanosin <u>t</u> riphosphat
DLG5	<u>D</u> rosophila Discs <u>L</u> arge <u>H</u> omolog 5
DNA	<u>D</u> esoxyribonuclein <u>a</u> cid
DNS	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxynukleosid <u>t</u> riphosphate
dTTP	<u>D</u> esoxythymidin <u>t</u> riphosphat
EGFR	<u>E</u> pidermal growth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
GNAI2	Inhibitory guanine nucleotide-binding protein
HGFR	<u>H</u> epatocyte growth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor
HLA	<u>H</u> uman <u>l</u> eukocyte <u>a</u> ntigen
HSP	<u>H</u> eat <u>s</u> hock <u>p</u> rotein
IBD	<u>I</u> nflammatory <u>b</u> owel <u>d</u> isease
ICAM	<u>I</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule 1
IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> eron
IKK	<u>I</u> κ <u>B</u> - <u>K</u> inase
IKKi	<u>I</u> KK <u>i</u> nducible I B kinase
IκB	<u>i</u> nhibitor of NF <u>κ</u> <u>B</u>
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
IL-R	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin- <u>R</u> ezeptor
IRAK	<u>I</u> L-1 <u>r</u> eceptor <u>a</u> ssociated <u>K</u> inase
IRAK-M	<u>I</u> RAK- <u>m</u> onocytes / macrophages
IRF	<u>i</u> nterferon <u>r</u> egulatory <u>f</u> actor
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

LRR	<u>l</u> eucine- <u>r</u> ich <u>r</u> epeat
Mal	<u>M</u> yD88- <u>a</u> daptor- <u>l</u> ike
MC	<u>M</u> orbus <u>C</u> rohn
MDP	<u>M</u> uramyl <u>d</u> i <u>l</u> eptid
MHC	<u>M</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
MIF	<u>M</u> acrophage migration <u>i</u> nhibitory <u>f</u> actor
MLN	<u>m</u> esenteric <u>l</u> ymph <u>n</u> ode
MyD88	<u>M</u> yeloid <u>d</u> ifferentiation factor <u>88</u>
MyD88s	<u>M</u> yD88 <u>s</u> hort
NAK	<u>N</u> F- κ B- <u>a</u> ctivating <u>k</u> inase
NAP1	<u>N</u> AK- <u>a</u> ssociated protein
NBD	<u>n</u> ucleotide <u>b</u> inding oligomerization <u>d</u> omain
NF- κ B	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor κ B
NOD	<u>n</u> ucleotide-binding <u>o</u> ligomerization <u>d</u> omain
NSAR	<u>N</u> icht- <u>s</u> teroidale <u>A</u> ntirheumatika
PAMP	<u>P</u> athogen <u>a</u> ssociated <u>m</u> olecular <u>p</u> attern
PCR	<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PI3K	<u>P</u> hosphadityl <u>i</u> nositol- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PRR	<u>P</u> attern <u>r</u> ecognition <u>r</u> eceptor
RHIM	<u>R</u> IP <u>h</u> omotypic <u>i</u> nteraction <u>m</u> otif
RIP	<u>R</u> eceptor <u>i</u> nteracting protein <u>1</u>
RNS	<u>R</u> ibon <u>u</u> kleinsäure
ROR γ t	<u>r</u> etinoid-related <u>o</u> rphan <u>r</u> eceptor γ t
SARM	<u>s</u> terile α and HEAT / <u>A</u> rmadillo <u>m</u> otif protein
SIGIRR	<u>s</u> ingle <u>i</u> mmunoglobuline <u>I</u> L- <u>1</u> <u>R</u> - <u>r</u> elated molecule
SNP	<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism
SOCS 1	<u>s</u> uppressor <u>o</u> f cytokine <u>s</u> ignalling
STAT	<u>S</u> ignal <u>t</u> ransduktoren und <u>A</u> ktivatoren der <u>T</u> ranskription
TAB	<u>T</u> AK- <u>b</u> inding protein
TAK	<u>t</u> ransforming growth factor- β - <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase
TANK	<u>T</u> NFR-associated factor family member-associated <u>N</u> F- κ B activator
TBK1	<u>T</u> ANK- <u>b</u> inding <u>k</u> inase 1
TCR	<u>T</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor
TGF	<u>t</u> ransforming (tumor) growth <u>f</u> actor
Thr399Ile	<u>T</u> hreonin 399 <u>I</u> soleucin
TICAM-1	<u>T</u> IR domain <u>c</u> ontaining <u>a</u> daptor <u>m</u> olecule <u>1</u>
TIFA	<u>T</u> RAF- <u>i</u> nteracting protein with a <u>f</u> orkhead- <u>a</u> ssociated (FHA) domain
TIR	<u>T</u> oll-/Interleukin-1- <u>R</u> ezeptor
TIRAP	<u>T</u> IR domain containing <u>a</u> daptor <u>p</u> rotein
Tirp	<u>T</u> IR-domain containing <u>p</u> rotein
TLR	<u>T</u> oll- <u>l</u> ike <u>R</u> ezeptor

Abkürzungsverzeichnis

TNF	<u>T</u> umor- <u>N</u> ekrose- <u>F</u> aktor
TNF-R	TNF- <u>R</u> ezeptor
TRAF	<u>T</u> NF- <u>r</u> eceptor <u>a</u> ssociated <u>f</u> actor
TRAM	<u>T</u> RIF- <u>r</u> elated <u>a</u> daptor <u>m</u> olecules
TRIF	<u>T</u> IR- <u>d</u> omain-containing adaptor inducing <u>I</u> FN- β
UBC13	<u>U</u> biquitin- <u>c</u> onjugating enzyme 13
UC	<u>U</u> lcerative <u>C</u> olitis
UEV1A	<u>U</u> biquitin-conjugating <u>e</u> nzyme E2 <u>v</u> ariant 1A
WASP	<u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich- <u>S</u> yndrom- <u>P</u> rotein

10 Danksagung

Am Ende meiner Doktorarbeit angelangt, möchte ich es keinesfalls versäumen, mich bei einigen Menschen für ihre Unterstützung im jahrelangen Promotionsprozess zu bedanken.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Helmut Diepolder für die Übernahme der Rolle des Doktorvaters danken.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Stephan Brand für die Überlassung des interessanten Themas und der hervorragenden, unermüdlichen Betreuung im gesamten Promotionsprozess. Er verstand es, mich zu motivieren und förderte maßgeblich mit seinen kontinuierlichen Bemühungen die Entstehung und die Qualität dieser Arbeit.

Dem gesamten Team der Molekularbiologie um Herrn PD Dr. Peter Lohse im Institut für Klinische Chemie Großhadern danke ich für die gute experimentelle Einarbeitung und Anleitung, die mir ein unabhängiges Arbeiten in einer angenehmen und produktiven Arbeitsatmosphäre ermöglichte.

Für die Hilfe im klinischen Teil der Arbeit bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der CED-Ambulanz Großhadern. Sehr herzlich möchte ich insbesondere Simone Pfennig meinen Dank wissen lassen, für ihre aufmunternde Art und ihre fortwährende Unterstützung bei der Klärung zahlreicher Fragen.

Fabian Schnitzler gilt mein Dank für die Überlassung der NOD2-Daten für meine Vergleichsanalysen.

Für die Unterstützung bei der statistischen Ausarbeitung möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Alexander Crispin aus dem Institut für Medizinische Informatik Biometrie Epidemiologie der LMU München (IBE) bedanken.

Viele Studienkollegen und Freunde, darunter insbesondere Katrin Hofbauer, zeigten mir, dass niemand mit den Problemen, die ein solches Werk in sich birgt, alleine ist. Danke.

Besonderen Dank möchte ich auch meiner Familie aussprechen; meinen Eltern Rudolf und Monika Staudinger sowie meinem Ehemann Tobias Schmid, die mir das ganze Studium überhaupt ermöglicht haben und mir immer den Rücken gestärkt haben.

11 Curriculum vitae

Tanja Staudinger • Sonnenhang 37 • 85305 Jetzendorf • Tel.: 08137 – 9182

n Persönliche Daten

Name: Tanja Staudinger
Geburtsdaten: 01.05.1979
Familienstand: verheiratet, 1 Kind
Ehemann: Tobias Schmid, geb. 19.12.1978
Kommunikationselektroniker

n Schulbildung

1985 – 1989 Grund- und Teilhauptschule in Jetzendorf
1989 – 1998 Schyren-Gymnasium Pfaffenhofen a.d. Ilm
Abiturnote: 2,1

n Studium

04/2000 – 05/2006 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
04/2002 Physikum, Note: 2,00
04/2003 1. Staatsexamen, Note: 2,00
03/2005 2. Staatsexamen, Note: 1,66
2005 /2006 Praktisches Jahr:
- Universitätsklinikum, Campus Großhadern / München LMU (Radiologie)
- Klinikum Ingolstadt, Medizinische Klinik II
- Klinikum Ingolstadt, Chirurgische Klinik I
04.05.2006 3. Staatsexamen, Note 1,00

n Praktische Tätigkeiten

09/1998 – 08/1999 Freiwilliges Soziales Jahr unter der Trägerschaft des Deutschen Paritätischen Wohlfahrtsverbandes im Kreiskrankenhaus München-Pasing

Curriculum vitae

- 11 /1999 - 03/2000 Sanitätshelfer- und Rettungsdiensthelfer-
lehrgang, inkl. Rettungswagen-Praktikum,
Allgemeine Sanitätshilfe e.V., München
- 08/2002 Famulatur in der Kardiologie
(Klinikum Ingolstadt, Medizinische Klinik I)
- 09/2002 Famulatur in der gastroenterologischen
Schwerpunktpraxis Dr. Höchter / Dr. Weingart
(München)
- 02/2004 Famulatur in der Dermatologie und Allergologie
(Krankenhaus München-Schwabing)
- 09/2004 Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe
(Universitäts-Frauenklinik Basel, Schweiz)
- ab 04/2007 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin
(Klinikum St-Elisabeth in Neuburg a.D.)

Dateiname: TLR4_122008.doc
Verzeichnis: C:\Users\tanja\Documents\Doktorarbeit\Schriftstück\Deutsch\Hauptdokument
Vorlage: C:\Users\tanja\AppData\Roaming\Microsoft\Vorlagen\Normal.dot
Titel: Der Einfluß der TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile auf die Pathogenese und den Phänotyp des Morbus Crohn
Thema:
Autor: Tanja Staudinger
Stichwörter:
Kommentar:
Erstelldatum: 10.12.2008 22:34
Änderung Nummer: 12
Letztes Speicherdatum: 18.12.2008 09:48
Zuletzt gespeichert von: Tanja Staudinger
Letztes Druckdatum: 18.12.2008 10:28
Nach letztem vollständigen Druck
Anzahl Seiten: 96
Anzahl Wörter: 154.609 (ca.)
Anzahl Zeichen: 881.272 (ca.)