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

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

Die Rolle des CRP +1059G/C-Polymorphismus beim Morbus Crohn:

Auswirkungen auf Krankheitssuszeptibilität, Phänotyp und Serumspiegel des C-reaktiven Proteins

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

Vorgelegt von
Dominik Michael Thalmaier
aus

Peißenberg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität

Berichterstatter: **Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Brand**

Mitberichterstatter: **Prof. Dr. Sibylle Koletzko**

Priv.-Doz. Dr. Max Schnurr

Dekan: **Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR**

Tag der mündlichen Prüfung: 15. 10. 2009

Meinen Eltern und Großeltern gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Thalmaier D, Dambacher J, Seiderer J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, Otte JM, Crispin A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Brand S.

The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with Crohn's disease.

Alimentary Pharmacology & Therapeutics 2006 Oct 1;24(7):1105-15

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung *9*

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen **9**

1.1.1 Geschichte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen 9

1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese des Morbus Crohn 10

1.1.3 Genetische Grundlagen des Morbus Crohn 16

1.1.4 Klinik des Morbus Crohn 20

1.1.5 Aktivitätsindices 21

1.2 Das C-reaktive Protein **22**

1.2.1 Die Rolle des CRP bei entzündlichen Krankheitsprozessen 22

1.2.2 Polymorphismen im CRP-Gen 24

2 Fragestellung der Arbeit *27*

3 Patienten, Methoden, Materialien *28*

3.1 Patienten- und Kontrollgruppe **28**

3.2 Methoden **29**

3.2.1 Isolation der DNA aus Vollblut 29

3.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der PCR 30

3.2.3 Reinigung des PCR-Produkts 33

3.2.4 Digestion der DNA mit Restriktionsendonukleasen 33

3.2.5 Analyse der Restriktionsfragmente mit der Gelelektrophorese 35

3.2.6 Genotypisierung der *NOD2/CARD15*-Varianten 36

3.2.7 Bestimmung der CRP-Konzentration im Serum 36

3.2.8 Statistische Methoden 37

3.3 Materialien **38**

3.3.1 Chemikalien 38

3.3.2 Geräte 38

4 Ergebnisse *39*

4.1 Demographische Merkmale der Studienpopulation **39**

4.2 Die Vienna-Klassifikation **39**

4.3 Häufigkeitsverteilung des *CRP +1059*-SNP in Patienten- und Kontrollgruppe 41

4.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen 44

4.5 CRP-Serumspiegel, Krankheitsaktivität und *CRP +1059*-Genotyp. 45

4.5.1 CRP-Konzentration und Krankheitsaktivität 45

4.5.2 CRP-Konzentration und *CRP +1059*-Genotyp 47

4.5.3 Der Einfluss des Geschlechts auf den Zusammenhang zwischen CRP-Konzentration und *CRP +1059*-Genotyp 48

4.6 Zusammenschau mit den drei *NOD2/CARD15*-Varianten 50

5 Diskussion 52

5.1 Der Einfluss des *CRP +1059*-Polymorphismus auf Krankheitssuszeptibiliät und Krankheitsphänotyp beim M. Crohn 52

5.1.1 *CRP +1059*-Polymorphismus und Krankheitssuszeptibilität 52

5.1.2 *CRP +1059*-Polymorphismus und Krankheitsphänotyp 54

5.2 Assoziation zwischen CRP-Serumspiegel und *CRP +1059*-Polymorphismus 57

5.3 Kritische Betrachtung der Studienpopulation 57

5.4 CRP-Serumspiegel und das Ansprechen auf immunsuppressive Therapien 59

6 Zusammenfassung 62

7 Tabellen und Abbildungsverzeichnis 64

7.1 Tabellenverzeichnis 64

7.2 Abbildungsverzeichnis 65

8 Literaturverzeichnis 67

9 Danksagung 76

10 Lebenslauf 77

Abkürzungen

A	Adenosin
AIEC	Adhärente invasive E. coli
ATG16L1	Autophagy-related 16-like 1 gene
Bp	Base pair
C	Cytosin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CDAI	Crohn´s disease activity index
CECAM	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CX3CR1	Fractalkin-Receptor
DC	Dendritic cells
G	Guanosin
IBD	Inflammatory bowel disease
IL	Interleukin
IRGM	Immunity-related GTPase Family, M
IRGM	Immune-related GTPase family, M
KHK	Koronare Herzkrankheit
LRR	Leucin rich repeats
MC	Morbus Crohn
MDP	Muramyl-Dipeptid

MHC	Major histocompatibility complex
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
NBD	Nucleotide binding domain
NCBI	National center for biological information
NOD	Nucleotide binding and oligomerization domain
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerase chain reaction
PRR	Pattern recognition receptor
PTGER4	Prostaglandin Receptor EP4
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SNP	Single nucleotide polymorphism
Taq	Thermophilus aquaticus
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
UTR	Untranslated region

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.1.1 Geschichte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Mit dem heutigen Wissen über Klinik und Verlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist es möglich, auf der Grundlage von jahrhundertealten Schilderungen von Symptomen, Autopsieberichten und Einzelfallbeschreibungen, einzelnen „historischen“ Patienten nachträglich mit hinreichender Sicherheit zumindest die Verdachtsdiagnose „Morbus Crohn“ (M. Crohn) oder „Colitis ulcerosa“, den beiden Hauptformen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, (CED) zu stellen.

So berichtet zum Beispiel Wilhelm Fabry 1612 über die Autopsie eines 20-jährigen Mannes der mit Diarrhöen und Fieber verstarb, und bei der Obduktion mit intestinalen Ulzera, einer Perforation des terminalen Ileums und Vergrößerungen der mesenterialen Lymphknoten durchaus das klinisch-pathologische Bild eines Morbus Crohn geboten hat. 1793 berichtet Matthew Bailles (55) von einigen Patienten, die wahrscheinlich an Colitis ulcerosa verstarben. Weitere Einzelfallberichte könnten an dieser Stelle angebracht werden, müssten aber mit gleicher Vorsicht wie die beiden geschilderten bedacht werden, denn vor allem eine tuberkulöse Darmerkrankung kann rückblickend nicht immer ausgeschlossen werden. Erst in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts wird es durch Fortschritte in der bakteriologischen Forschung möglich, die Colitis ulcerosa von anderen infektiösen Kolitiden abzugrenzen. Die erste genaue Beschreibung dieser Krankheit dürften wohl S. Wilks (1859) und S. Wilks und W. Moxon (1875) geliefert haben (55).

Erst mehrere Jahrzehnte später, im Jahr 1932, veröffentlichte Burill. B. Crohn (23) vom Mount Sinai Hospital in New York zusammen mit Kollegen seine bahnbrechende Beschreibung der nicht-tuberkulösen Ileitis terminalis und definiert somit eine eigene, später nach ihm benannte Krankheits-Entität mit den klassischen Krankheitsmerkmalen:

> *„affecting mainly young adults, characterized by subacute or chronic necrotizing and cicatrizing inflammation, the ulceration of the mucosa is accompanied by a disproportionate connective tissue reaction (…), a process which frequently leads to stenosis of the lumen of the intestine, associated with the formation of multiple fistulas”* (23)

In der Folge wächst durch weitere histologische Untersuchungen, große multizentrische Studien und technische Fortschritte das Wissen um den Morbus Crohn. R. Colp berichtet 1934 über eine Gruppe von Patienten mit Ileo-Kolitis Crohn. Daraufhin musste die Idee einer auf Ileum und Dünndarm beschränkten Erkrankung aufgegeben werden. 1960 zeigen Lockhart-Mummery und Morson (63) die pathologische Abgrenzung zur Colitis ulcerosa. Die Verbreitung der Ileo-Koloskopie und die damit verbundene Erleichterung bioptischer Untersuchung um 1970 ermöglicht eine genaue Differenzierung zwischen M. Crohn und Colitis ulcerosa.

Bis heute wächst das Wissen über die CED ständig an. Gegenwärtig liegt besonderes Augenmerk auf der Erforschung der genetischen Grundlagen der CED.

1.1.2 Epidemiologie und Pathogenese des Morbus Crohn

1.1.2.1 Epidemiologie

In den letzten 50 Jahren sind die CED zu einem der großen Probleme der Gastroenterologie geworden. Die meisten Veröffentlichungen geben etwas größere Inzidenzen für die Colitis Ulcerosa als für den M. Crohn an. Je nach Literaturangabe liegen diese zwischen 15 bis 20 pro 100.000/Jahr für die Colitis und um 6,0 pro 100.000/Jahr für den M. Crohn (33).

Weitere bedeutende Erkenntnisse der deskriptiven Epidemiologie sind ein rapider Anstieg der Inzidenzwerte für den M. Crohn in der Nachkriegszeit bis in die 1970er Jahre mit anschließendem flacheren Ansteigen der Inzidenz bis in unsere Zeit (87). Zudem ist eine unterschiedliche geographische Verteilung der Krankheitshäufigkeiten bemerkenswert. Zeitweise wurde sogar ein großes Nord-Süd-Gefälle, analog zur Multiplen Sklerose, vermutet (96). Die anfänglich vermutete Stärke dieses geographischen Effektes konnte aber in der Folge nicht bestätigt werden. Methodische Ungenauigkeiten in der Untersuchung von Shivannada (96), diagnostische Sensibilisierung in Zentren für CED und weitere Faktoren, die die Häufigkeit des Auftretens von CED beeinflussen, schwächen diesen dennoch vorhandenen Effekt ab (105). Einen Erwähnenswerten Einfluss auf das Erkrankungsrisiko des M. Crohn hat das Zigarettenrauchen. Eine Metaanalyse von Mahid et al. fand hier unter Berücksichtigung von 245 Originalarbeiten ein 1,76fach erhöhtes relatives Risiko, an M. Crohn zu erkran-

ken; ursächlich dafür scheinen Mikroinfarkte in der Darmwand zu sein (67). Vergleichbare Effekte haben orale Kontrazeptiva durch deren thrombogene (Neben)Wirkung (110), (40). Die synchrone Zunahme synthetischer Nahrungsmittelzusätze und der Erkrankungen an CED in westlichen Gesellschaften nach dem Krieg waren Grundlage der Theorie, die den Anstieg dieser Zusätze für das gehäufte Auftreten des M.Crohn verantwortlich machte. Insgesamt fehlen aber gut belegte Daten, um einen Zusammenhang zwischen Ernährungsfaktoren und Erkrankungsrisiko plausibel zu machen. Der Ansatz, die antiinflammatorische und damit protektive Wirkung der z.B. in Fischöl enthaltenen Omega-3-Fettsäuren in der Behandlung des M.Crohn zu nutzen, fügt sich dennoch gut in das pathophysiologische Gesamtkonzept der CED ein (66).

1.1.2.2 Pathogenese

Das heutige Verständnis der Pathogenese der CED wird von unserem Wissen um das Zusammenspiel von folgenden drei zentralen Faktoren bestimmt: Umweltbedingungen, Dysregulationen der Immunantwort und spezifischen genetischen Faktoren. Insbesondere den genetischen Faktoren wird eine besondere Rolle zugesprochen, denn sie modulieren einerseits den Effekt von Umweltfaktoren und sind andererseits verantwortlich für das Entstehen der immunologischern Dysregulationen. Vor allem das pathophysiologisch wichtige Konzept des Ungleichgewichts zwischen inflammatorischen und entzündungshemmenden Zytokinen sei hier genannt (47). Die normale Darmfunktion verlangt eine diffizile Balance zwischen der Abwehr gesundheitsgefährdender Reize und der Inhibition einer systemischen Reaktion auf Kommensalier und Ernährungsproteine. Dieses Gleichgewicht wird als orale Toleranz bezeichnet. Im Tierversuch kann die Dysregulation des Immunsystems durch fehlenden Antigenreiz bewiesen werden. Weder das von Plasmazellen sezernierte IgA noch das antinflammatorisch wirkende Zytokin TGF-β finden sich unter experimentellen Bedingungen in keimfreien Därmen von Tieren. Dies unterstreicht die enorme Bedeutung der physiologischen Darmflora (95). Im Kolon finden sich pro Gramm Stuhl durchschnittlich 10^{12} Bakterien; (90) diese bilden somit ein riesiges Antigenreservoir (95). Wesentlich für die Störung der oralen Toleranz ist die ungehemmte Polarisierung der naiven CD4-positiven-T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen. Ein Überwiegen der Th2-Zellen führt u.a. zur Atopie, ein vermehrtes Auftreten von Th1-Zellen trägt zum Auftreten einer Helicobacter-pylori induzierten Gastritis oder M. Crohn bei (37). Um diesen Prozess einzuleiten, müssen Antigen präsentierende Zellen (APC), wie Makrophagen

und dendritische Zellen mit ihren Pattern-Recognition Receptors (PRR) evolutionär hochkonservierte Motive bakterieller Oberflächen erkennen (Pathogen associated molecular patterns, PAMP). Die adäquate Stimulation und Differenzierung der naiven T-Zellen ist dann von folgenden drei Größen abhängig: (10)

- Antigen-spezifische Präsentation der Peptide durch die MHC-Moleküle.
- Kostimulation durch akzessorische Moleküle auf den APC, die mit Rezeptoren in der Umgebung des T-Zell Rezeptors interagieren.
- Konzentration und Zusammensetzung der Zytokine in der Umgebung der naiven T-Zelle.

.

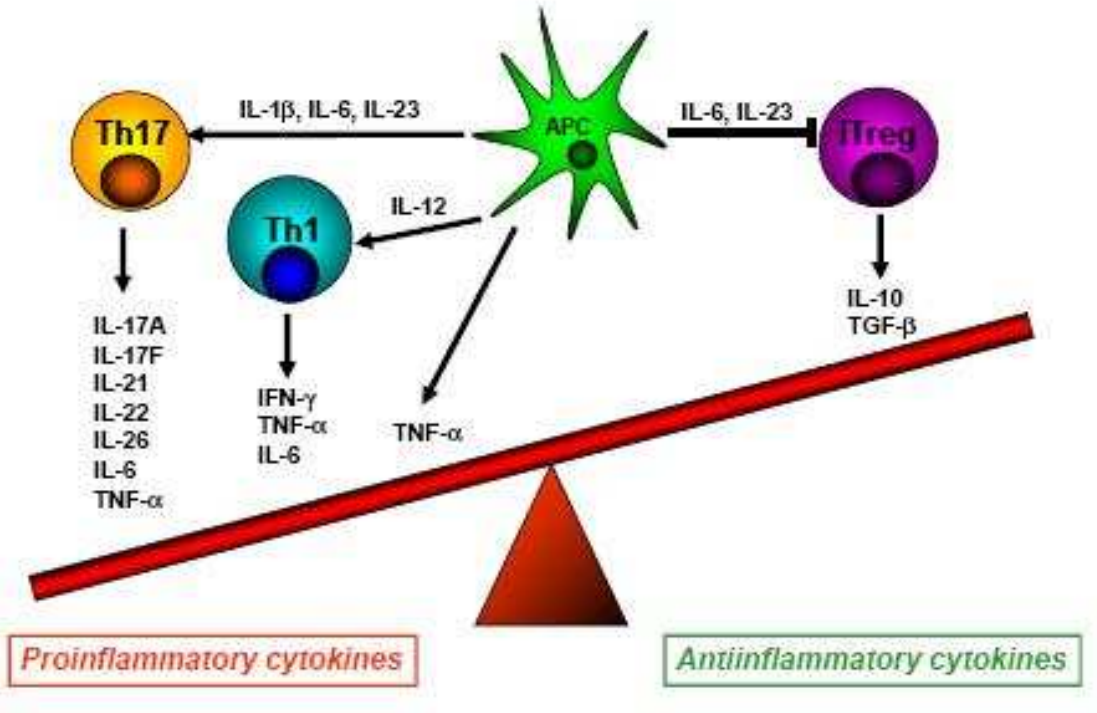

Abb. 1: Die Dysbalance von pro-und antiinflammatorischen Zytokinen beim M. Crohn (13)

An der Stimulation proinflammatorischer CD4-positiver Zellen wirken intestinale Epithelzellen mit. Neuere Daten legen nahe, dass beim MHC I- und MHC II- abhängigen Prozessieren von luminalen Antigenen multivesikuläre späte Endosomen beteiligt sind. In den Endosomen an M. Crohn erkrankter Personen reichern sich MHC I- und MHC II-Moleküle an. In den Epithelien gesunder Individuen ist dies nicht der Fall (51). MHC II ließ sich zudem nur auf den Epithelien entzündlich veränderter Kolonschleimhaut nachweisen (51). Weitere Ansätze, die die Pathogenese des M. Crohn untersuchen, verfolgen die Aktivierung von CD8-positiven regulatorischen T-Zellen durch das intestinale Epithel. Die Epithelzellen fungieren als primitive APC und präsentieren den CD8-positiven Zellen MHC I abhängig Antigene. M. Crohn-Patienten

exprimieren im Gegensatz zu gesunden Probanden kein CD1d, ein Klase Ib-Molekül, auf der Mukosaoberfläche. CD1d-abhängige regulatorische T-Zellen können also nicht aktiviert werden (79). Da diesen Zellen supprimierende Funktionen zugeschrieben werden, liefert dieser Defekt einen weiteren Baustein zur Erklärung der Pathogenese des M. Crohn (106).

Neue Erkenntnisse unterstreichen vor allem die Bedeutung der entzündungsfördernden Th-17-Zellen bei der Pathogenese des M. Crohn. Für die Funktionsfähigkeit der CD4-positiven Th-17 Zellen ist in vivo IL-23 notwendig (68). Dieses Interleukin ähnelt dem von CD4-positiven Th-1-Zellen produzierten IL-12. Die funktionelle Beziehung zwischen den IL-17 sezernierenden Th-17 Zellen und dem IL-23 wird auch als Interleukin-23/Interleukin-17-Achse der intestinalen Inflammation bezeichnet. Kürzlich konnte ein Zusammenhang zwischen der genetischen Suszeptibilität für M. Crohn und der Th-17 Zellfunktion gezeigt werden. Die Serumspiegel des ebenso von Th-17-Zellen produzierten IL-22 korrelieren positiv mit der entzündlichen Aktivität bei M.Crohn-Patienten. Die Stärke der Expression von IL-22 wird aber auch vom Genotyp des *IL23R* der TH-17 Zelle beeinflusst. Die untersuchten SNP im Gen des *IL-23*R sind mit dem Erkrankungsrisiko für M. Crohn assoziiert (91).

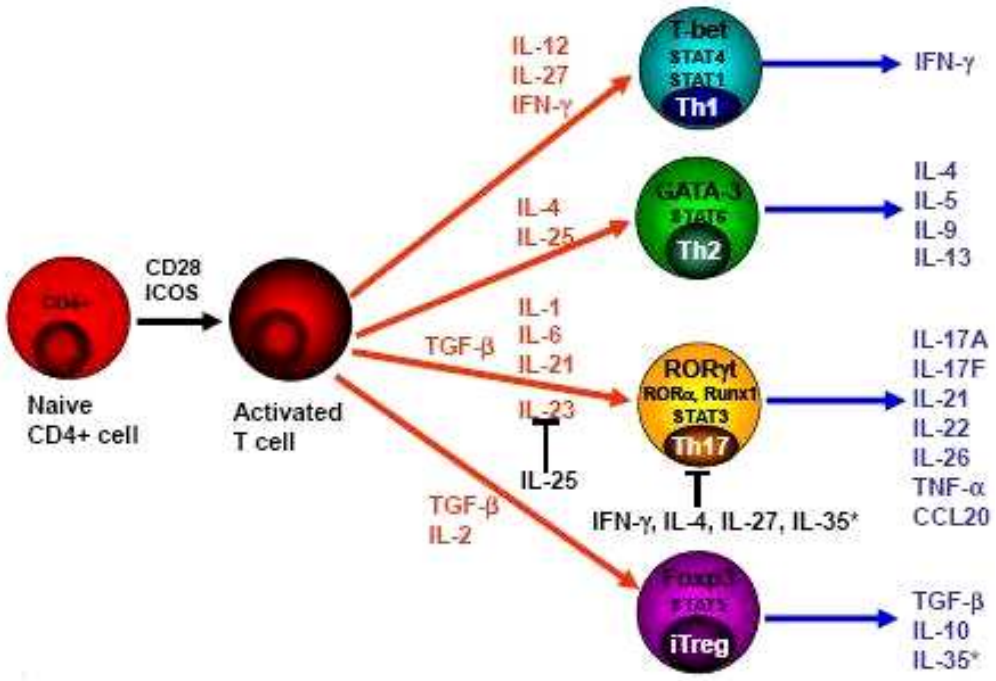

Abb. 2: Entwicklung von Th1, Th2, Th17 und Treg-Zellen aus naiven CD4+-Zellen (13)

Der Toll-like-receptor 4 (TLR4) wird unter anderem auf intestinalen Epithelzellen exprimiert und agiert als Bindestelle für Lipopolysaccharid (LPS), dem Hauptbestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien (58). Dieser Rezeptor ist wesentlich an der Aufrechterhaltung der Homöostase des intestinalen Epithels beteiligt. Knockout-Mäuse, deren TLR4 vermittelte Signalübertragung abgeschaltet ist, sind anfälliger für eine durch Dextran-Sodium-Sulphat ausgelöste Kolitis als Wildtyp-Mäuse (57, 83). In einer Deutschen Kohorte fand sich der *Asp299Gly*-Polymorphismus im *TLR4*-Gen nahezu zweimal häufiger bei M. Crohn-Patienten als in der gesunden Kontrollgruppe; auch der *Thr399Ile* SNP kam bei diesen Patienten signifikant häufiger vor. Zudem hatten Patienten, die keine der drei häufigen *NOD2/CARD15*-Varianten aufwiesen, aber mindestens einen der beiden TLR4-Polymorphismen trugen, signifikant häufiger einen stenosierenden Phänotyp (16). Mastzellen reagieren auf den inflammatorischen Reiz von Interferon-gamma indem sie TLR4 auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Solche Zellen finden sich beim M. Crohn signifikant häufiger als in einer gesunden Kontrollgruppe (57). Der TLR4 ist Teil der angeborenen Immunität. Daraus lässt sich schließen, dass Mutationen wie der *Asp299Gly*-Polymorphismus über die Beeinflussung dieser Immunität zu einem bestimmten klinischen Krankheitsbild wie dem M. Crohn führen können (11).

Die schon erwähnte hohe Anzahl von Darmbakterien pro Gramm Stuhl im Dickdarm lässt in Zusammenschau mit den bisher erwähnten Fakten den Schluß zu, dass Mikroben bei der Pathogenese des M. Crohn eine wesentliche Rolle spielen. Gewebeproben aus dem Kolon erkrankter Personen zeigen im Vergleich zu gesunden Personen sowohl eine größere Anzahl von Bakterien, als auch eine dickere Schicht, die diese auf der intestinalen Schleimhaut bilden (56, 100). Zusätzlich findet sich bei erkrankten Personen eine besonders geringe Bandbreite an Bakterien-Spezies mit einer Häufung von Proteobacteria und Bacterioides phyla. Selten dagegen kommen die verschiedenen Mitglieder der Gruppe der Firmicutes phylum vor (94). Diese Beobachtungen ursächlich und erklärend in unser Entstehungsbild des M. Crohn einzuordnen, ist noch nicht befriedigend gelungen. Eckburg (32) führt dies auch auf die methodischen Schwierigkeiten zurück, die sich dem Forscher bei der Untersuchung der Darmflora stellen, beginnend mit der Fragestellung, ob die bakterielle Zusammensetzung der Faeces oder die direkt auf der Mukosa, die sich beide voneinander unterscheiden, Gegenstand der Untersuchung sein soll (32). In letzter Zeit zeigten Arbeiten, die die Expression von CECAM6 (Carcinoembryonic antigen-related cell

adhesion molecule 6) im Darm untersuchten, den Zusammenhang zwischen dem außergewöhnlichem Vorkommen invasiver Bakterienstämme und der genetischen Suszeptibilität für den M. Crohn.

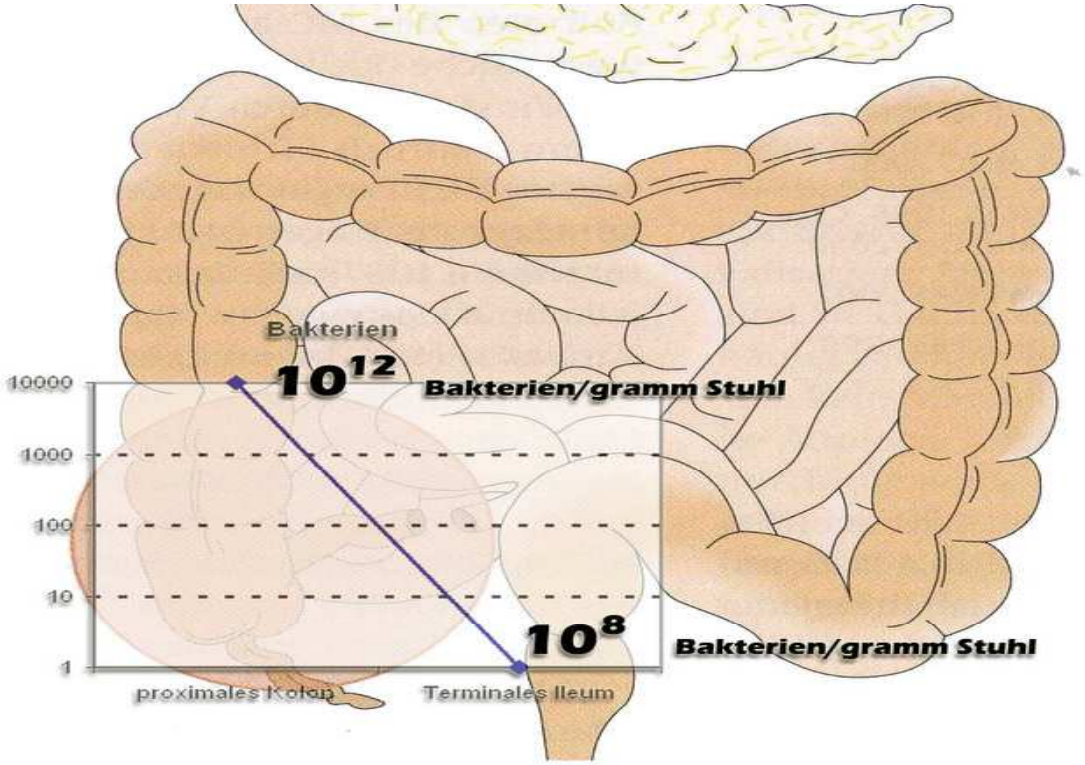

Abb. 3: Zehntausendfacher Anstieg der Bakterienkonzentration vom terminalen Ileum zum Coecum/proximalen Kolon

Region	Chromosom	Gene of interest	Suszeptibilität
IBD1	16q12	*NOD2*	M. Crohn
IBD2	12q13, 2q24	unbekannt	Colitis ulcerosa
IBD3	6p5	unbekannt	CED
IBD4	14q11	*SLC22A4/5*	M. Crohn
IBD5	5q31-33	unbekannt	M. Crohn
IBD6	19p13	unbekannt	CED
IBD7	1p36	unbekannt	CED
IBD8	1612	unbekannt	M. Crohn
IBD9	3p26	unbekannt	CED

Tab. 1: Mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziierte genetische Risikomarker (20, 21, 30, 31, 45, 50, 84, 88).

CECAM6 agiert als Bindungsstelle für adhärente invasive E. coli (AIEC). Dadurch steigt die Konzentration dieses Bakterienstammes auf abnormal hohe Werte an; die Mikroben können in das intestinale Epithel eindringen und somit die Sekretion von TNF-α und die Bildung von Granulomen induzieren. Diesem Bakterium gelingt es also, durch Bindung an CECAM6, das auf dem intestinalen Epithel exprimiert wird, die Schleimhautbarriere zu überwinden (4). In infizierten Makrophagen replizieren sich die Bakterien und induzieren eine inflammatorische Antwort (5).

1.1.3 Genetische Grundlagen des Morbus Crohn

Die folgende Übersicht über die genetischen Grundlagen des M. Crohn behandelt vor allem die Bedeutung von *NOD2/CARD15*, da dieses Gen von besonderer Bedeutung für das Verständnis dieser Arbeit ist.

Erste Erkenntnisse einer starken familiären Häufung von CED wurden in den 80ern des vorigen Jahrhunderts gemacht (60, 108) und ergaben bei systematischer Aufarbeitung dieser Beobachtungen für Nachkommen von Familien mit an M. Crohn erkrankten Mitgliedern ein 15-35fach erhöhtes Erkrankungsrisiko (60). Die breite Variation der gefundenen relativen Risiken erklärt sich durch unterschiedliche Studienpopulationen und verschiedene Untersuchungsmethoden in den einzelnen Studien. Auch in großen Familien kann kein Mendel´scher Erbgang gefunden werden, somit muss ein polygener Vererbungsprozess angenommen werden. Mittlerweile konnten mit Hilfe genomweiter Kopplungsstudien neun mit CED assoziierte genetische Risikoloci ermittelt werden, deren Genorte von IBD1 bis IBD9 durchnummeriert wurden. Eine Übersicht gibt Tabelle 1 (12). Eine von Barrett et al. (6) Ende 2008 veröffentlichte Metaanalyse genomweiter Assoziationsstudien hat die bisher bekannten Risikoloci der Tabelle 1 deutlich erweitert und ergänzt. Aktuell sind 30 eindeutige Genorte bekannt, welche die Suszeptibilität für den M. Crohn beeinflussen. Die bisherige IBD1 und ihr Gen *NOD2/CARD15* werden nun mit dem SNP-Code rs2066847 bezeichnet. Eine aktualisierte tabellarische Übersicht über die nun bekannten Risikoloci findet sich in Tabelle 2.

Von besonderem Interesse ist die 2001 beschriebene Kopplungsregion „IBD1“ (rs2066847), die auf Chromosom 16q12 liegt, und durch zahlreiche Studien am besten charakterisiert ist. Das Produkt des Gens *NOD2/CARD15* (nucleotide binding and

oligomerization domain 2, caspase recruitment domain familiy 15), das in dieser Genregion liegt, ist das cytoplasmatische Protein NOD2. Dieses Protein dient als Sensor für bakterielles Muramyl-Dipeptid (MDP) und sorgt für die Expression von antibakteriellen Alpha-Defensinen (80). NOD2 wird kontinuierlich in Makrophagen, Neutrophilen, Dendritischen Zellen sowie Paneth-Körner- und Epithelzellen exprimiert (52, 75). Drei Varianten des *NOD2/CARD15*-Gens sind besonders stark mit M.Crohn assoziiert; Träger dieser Polymorphismen produzieren weniger MDP-induzierte Defensine. Daraus resultiert eine verminderte Barrierefunktion des intestinalen Epithels, eine verstärkte intestinale Bakterien-Exposition ist die Folge. Im Ileum produzieren die Paneth-Zellen die Alpha Defensine HD5 und HD6, eine verringerte Konzentration dieser Peptide im Ileum erhöht die Wahrscheinlichkeit an einem M. Crohn zu erkranken. Andere Produkte der Paneth-Zellen sind bei diesen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nicht erniedrigt (112). Die Fähigkeit von NOD2 bakterielle Strukturen zu erkennen ist von einer Leucin-reichen Domäne (Leucin-rich repeat) des NOD2 abhängig, die für die MDP-Bindung essentiell ist. Dieser Ligand führt schließlich zur Aktivierung von NF-κB und somit zur Induktion proinflammatorischer Zytokine (62). Erst vor kurzem wurden zwei weitere Gene beschrieben, die mit dem M. Crohn assoziiert sind. Zum einen acht verschiedene Polymorphismen im Gen des *IL23*-Rezeptors (*IL23R*), sowie der *T300A*-Polymorphismus (rs2241880) im *autophagy-related 16-like 1 gene* (*ATG16L1*) (111). *ATG16L1* kodiert für ein Protein, das am intrazellulären processing (Verdau) von Bakterien in Autophagosomen beteiligt ist. Die Assoziation zwischen dem Erkrankungsrisiko für M. Crohn und diesem SNP erwies sich als hochsignifikant (43). In der Anfang 2007 veröffentlichten Originalarbeit wurden 19.779 SNP untersucht. Dem hier gefundenen Zusammenhang scheint ein Pathomechanismus zu Grunde zu liegen, der spezifisch für den M. Crohn ist, denn eine Assoziation mit der Colitis ulcerosa wurde nicht gefunden. Der Effekt des *T300A* Polymorphismus ist auch unabhängig von *NOD2/CARD15* und der IBD5 (81). Auch der IL23-Rezeptor ist an der Pathogenese des M. Crohn beteiligt. Interleukin-23 gehört zur Interleukin-12-Familie und triggert die Aktivierung und Differenzierung von Th-17-Zellen. Diese Zytokine sind den proinflammatorischen Zytokinen zuzurechnen (91),(24). Wiederum ist der hier gefundene Effekt stärker für den M. Crohn nachzuweisen als für die Colitis ulcerosa (107).

Mit Beendigung des humanen Genom-Projekts haben genomweite Assoziationsstudien neben dem *NOD2/CARD15*-Gen, dem *IL23R*-Gen und dem *ATG16L1*-Gen wei-

tere Gene identifiziert die die Suszeptibilität für den M. Crohn beeinflussen. Unter anderen wurden die Gene der Proteine IRGM und PTGER4 mit dem M. Crohn assoziiert. Auch wenn belastbare Daten fehlen ist es möglich, dass N*OD2/CARD15, IL23R, ATG16L1, IRGM* (Immunity-related GTPase family, M) und *PTGER4* (Prostaglandin E Receptor EP4) nicht nur das Erkrankunksrisiko für M. Crohn, sondern auch das Ansprechen auf antiinflammatorische Therapiestrategien modulieren (48, 115).

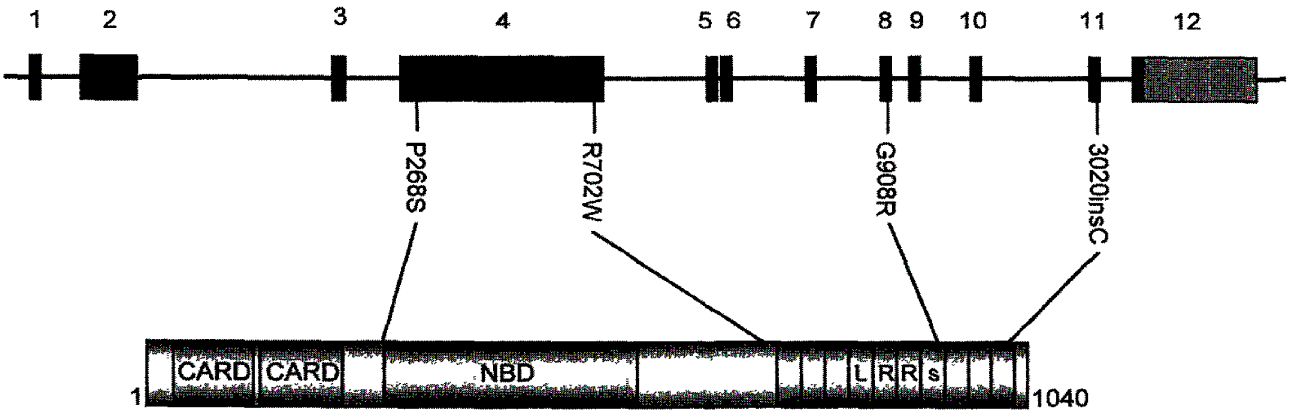

Abb. 4: Schema des Gens *NOD2/CARD15*. Die von Cuthbert untersuchten Polymorphismen und ihre Lokalisation im Protein NOD2/CARD15 (25) LRR: Leucin rich repeats.

SNP	Chromosome	Gene of interest	Risk allele
rs11465804	1p31	*IL23R*	T
rs3828309	2q37	*ATG16L1*	G
rs3197999	3p21	*MST1*	A
rs4613763	5p13	*PTGER4*	C
rs2188962	5q31		T
rs11747270	5q33	*IRGM*	G
rs4263839	9q32	*TNFSF15*	G
rs10995271	10q21	*ZNF365*	C
rs11190140	10q24	*NKX2-3*	T
rs2066847	16q12	*NOD2*	C
rs2542151	18q11	*PTPN2*	G
rs2476601	1p13	*PTPN22*	G
rs2274910	1q23	*ITL1*	C
rs9286879	1q24		G
rs11584383	1q32		T
rs10045431	5q33	*IL12B*	C
rs6908425	6q22	*CDKAL1*	C
rs2301436	6q27	*CCR6*	T
rs1456893	7p12		A
rs1551398	8q24		A
rs10748669	9p24	*JAK2*	C
rs17582416	10p11		G
rs7927894	11q13	*C11orf30*	T
rs11175593	12q12	*LRRK2, MUC19*	T
rs3764147	13q14		G
rs2872507	17q21	*ORMDL3*	A
rs744166	17q21	*STAT3*	A
rs1736135	21q21		T
rs762421	21q22	*ICOSLG*	G

Tab. 2.: Die 30 in der Metaanalyse von Barrett et al beschriebenen Suszeptibilitätsloci, die mit M. Crohn assoziiert sind (6).

1.1.4 Klinik des Morbus Crohn

Der M. Crohn ist eine chronische, schubweise verlaufende Krankheit, die mit Durchfall, Bauchschmerzen, Fieber und Gewichtsverlust einhergeht. Im akuten Schub sind Durchfälle das häufigste Symptom. Mehr als 80% der Patienten leiden dann unter zum Teil wässrigen Diarrhöen. Eine gewisse Häufung ist postprandial zu beobachten. 75% leiden unter Bauchschmerzen, die bei Befall des terminalen Ileums im rechten Unterbauch lokalisiert sind, und insbesondere bei zusätzlichem Fieber und einer Leukozytose, zur Diagnose einer akuten Appendizitis verleiten können. Blutige Diarrhöen treten unter Umständen bei Befall des Kolons auf, werden ansonsten im Rahmen der CED eher bei der Colitis ulcerosa gefunden. Eine Reihe von Komplikationen können den, von Patient zu Patient sehr variablen, Krankheitsverlauf erschweren:

- Stenosen
- Fisteln
- Abszesse
- Perforationen
- Kolorektales Karzinom und andere Neoplasien

Ein Mangel an Vitaminen, Spurenelementen und ein Gallensäureverlust wird durch Resorptionsstörungen in entzündlich veränderten Dünndarmabschnitten verursacht. Eine megaloblastäre Anämie durch Mangel an Vitamin B_{12} oder eine chologene Diarrhöe sind ebenfalls mögliche Folgen. Die Mortalität des M. Crohn ist heutzutage gering, nur wenige erkrankte Patienten versterben an dieser Krankheit, wie eine Übersichtsarbeit von Jees aus dem Jahr 2006 zeigt. Eine chronisch rezidivierende Krankheit wie der M. Crohn führt bei den Patienten aber zu körperlichen und seelischen Belastungen. Als Instrument zur Beurteilung der Lebensqualität dient das Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (53). Die Lebensqualität wird vor allem vom Schweregrad der Krankheitsschübe beeinträchtigt. Diese Beeinträchtigung korreliert positiv mit dem Crohn´s Disease Activity Index (CDAI) (39). Neben persönlichen Ressourcen, dem Auftreten der oben erwähnten Komplikationen und der Schwere der Krankheitsschübe wird die Lebensqualität auch vom jeweiligen Verlaufstyp, an dem ein bestimmter Patient leidet, beeinflusst. Einerseits kann der Verlauf durch das zeitliche Verhalten der Symptomatik unter besonderer Berücksichtigung des Ansprechens auf eine Steroid-Therapie, andererseits durch das Auftreten

von bestimmten Komplikationen definiert werden. Außerdem konnten mehrere Studien einen typischen Krankheitsablauf herausarbeiten. Die drei Hauptformen der Erkrankung, [1.] der entzündliche nicht-stenosierende, nicht-penetrierende Phänotyp, [2.] der stenosierende und schließlich [3.] der penetrierende , fistulierende Typ folgen meist zeitlich in dieser Reihenfolge aufeinander. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für die im Jahr 2000 veröffentlichte Vienna-Klassifikation des M. Crohn (38).

Für die vorliegende Arbeit ist diese weit verbreitete Klassifikation von besonderer Bedeutung. Eine erweiterte Version dieser Einteilung, die Montreal-Klassifikation, gliedert die Kategorie A in eine zusätzliche Gruppe mit Diagnosestellung vor dem vollendeten 16. Lebensjahr. Hier werden besonders häufig spezifische Sero- und Genotypen gefunden, die mit einem großen Erkrankungsrisiko assoziiert sind. Ausserdem sind in dieser Klassifikation die Lokalisationsmuster L1 bis L4 kombinierbar (z. B. L1 + L4) und ein möglicher perianaler Befall wird als sogenannter P-modifier eingeführt. (89, 98).

Kategorie A (Alter)	
A1	Diagnosestellung vor dem 40. Lebensjahr
A2	Diagnosestellung nach dem 40. Lebensjahr
Kategorie L (Lokalisation, Beurteilung vor erster Resektion)	
L1	Befall im terminalen Ileum
L2	Befall im Kolon
L3	Befall sowohl im Ileum als auch Kolon
L4	Befall im oberen Gastrointestinaltrakt
Kategorie B (Verhalten, Behaviour)	
B1	Entzündlicher, nicht-stenosierender, nicht-pentrierender Phänotyp
B2	Stenosierender Phänotyp
B3	Penetrierender, fistulierender Phänotyp

Tab. 3: Vienna-Klassifikation des M. Crohn nach Gasche et al (38)

1.1.5 Aktivitätsindices

Der undulierende Verlauf der Erkrankung und die nur unvollständige Kongruenz subjektiver (z.B. Bauchschmerzen, Wohlbefinden) und objektiver Krankheitsparameter (Fieber, Anämie) haben zur Entwicklung von Krankheitsaktivitätsindices geführt. Unter den heute etablierten Indices zur Einschätzung der Aktivität des M. Crohn ist der CDAI (7) der Gebräuchlichste und wurde auch auf die in diese Studie eingeschlossene Patienten angewandt. Der CDAI schließt sowohl objektive als auch subjektive Messgrößen in die Berechnung der Aktivität der Erkrankung ein. Andere Indices, wie

der Harvey-Bradshaw-Index, (46) berücksichtigen nur subjektive Parameter und der Van Hees-Index (109) hauptsächlich objektive Parameter.

In die CDAI-Berechnung gehen acht Parameter ein (Tab. 4.). Je stärker das Krankheitsbild ausgeprägt ist, desto mehr Punkte werden erreicht, wobei folgende Werte als Anhalt für die Erkrankungsschwere des M. Crohn gelten können:

1. Werte kleiner 150: Krankheit in Remission
2. Werte zwischen 150 und 300: aktive Erkrankung
3. Werte größer 300: schwerer Krankheitsschub (86).

Parameter des CDAI
Stühle, ungeformte und Durchfälle; Summe über eine Woche
Bauchschmerzen, tägliche Bewertung über eine Woche
Allgemeinbefinden, tägliche Bewertung über eine Woche
Andere Symptome, M. Crohn assoziiert
Antidiarrhoika Gebrauch in der letzten Woche; ja oder nein
Resistenz im Abdomen
Hämatokrit
Körpergewicht

Tab. 4: **Die acht Parameter die in die Berechnung des CDAI eingehen**. Jeder Messgröße ist eine bestimmte Punktzahl zugeordnet. Zur genauen Berechnung siehe Best et al., 1976 (7).

1.2 Das C-reaktive Protein

1.2.1 Die Rolle des CRP bei entzündlichen Krankheitsprozessen

Das C-reaktive Protein ist der klassische Vertreter eines Akute-Phase-Proteins und wird während der frühen Immunantwort auf einen entzündlichen Reiz hin freigesetzt (1). Es wird von Hepatozyten synthetisiert und gehört zur Gruppe der β-Globuline (76). Ein Anstieg im Plasma erfolgt durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-6 (113). Ein Konzentrationsanstieg im Plasma weist auf ein entzündliches Geschehen hin. Der Wert einer einzelnen Messung bis zu 24 Stunden nach dem Auftreten von Krankheitssymptomen liegt im Ausschluss oder der Bestätigung einer meist bakteriellen Entzündung. Im weiteren Krankheitsverlauf eilt ein Konzentrationsanstieg oftmals dem klinischen Krankheitsbild voraus (103). Das CRP hat eine biologische Halbwertszeit von 24 bis 48 Stunden, so dass ein Heilungsprozess serumchemisch gut und schnell dokumentiert werden kann (49).

Tillet und Francis beschrieben 1930 die Fähigkeit der Seren von Personen, die an einer akuten Lobärpneumonie erkrankt waren, mit dem „C“ des Lipopolysaccharids von Pneumokokken zu präzipitieren. Dieses „C“ entspricht einer phylogenetisch alten Variante des Phosphocholin. In der Folge wiesen sie diese Reaktion auch bei Patienten mit anderen Infektionskrankheiten nach (104).

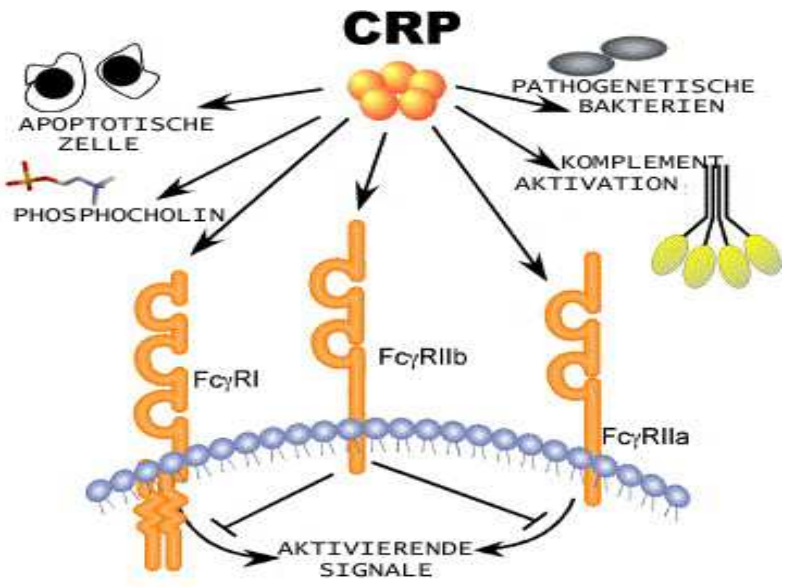

Abb.5: Liganden des CRP. Phosphocholin, der prototypische Ligand des CRP kommt auf einigen bakteriellen Membranen und zerstörten Zellen vor. Infolge der Ligation kommt es zur Aktivierung von Komplement und zur Opsonierung. Die stimulierenden Rezeptoren FcγRI und FcγRIIa müssen zur Entfaltung ihrer Wirkung über Kreuz gebunden werden. Werden auf gleiche Weise die inhibitorischen Rezeptoren FcγRIIb verbunden, werden aktivierende Signale geblockt. Graphik modifiziert nach Marnell et al., 2005 (69).

Das CRP setzt sich aus fünf identischen Untereinheiten zusammen, deren Anordnung in der Mitte eine Pore bildet. Funktionell kann diesem Pentamer eine Vorder- und Rückseite zugeordnet werden. (97). Die Vorderseite, auch das „recognition face“ genannt, bindet mit hoher Affinität an Phosphocholin auf der bakteriellen Zelloberfläche. Die Gegenseite, auch “effector face“ genannt, vermittelt das Zusammenspiel mit Faktor C1q des komplementären Immunssystems (3). CRP kann aber nicht nur Komplement aktivieren, sondern durch Bindung an die Fcγ-Rezeptoren I und IIa von phagozytierenden Zellen erkannte pathogene Bakterien eliminieren (8). Aktuell wird unter anderem die Funktion des CRP als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität untersucht, sowie seine Bedeutung als kardiovaskulärer Risikomarker diskutiert (77). In einer Studie wurde kürzlich untersucht ob bestimmte Haplotypen des CRP Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko nehmen. Der Haplotyp 4, der die jeweils selteneren Allele der SNPs *2667G>C* and *3872C>T* beinhaltet, erhöhte

die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei den 1029 teilnehmenden Personen. Der selbe Haplotyp war auch mit erniedrigten CRP-Spiegeln assoziiert (77).

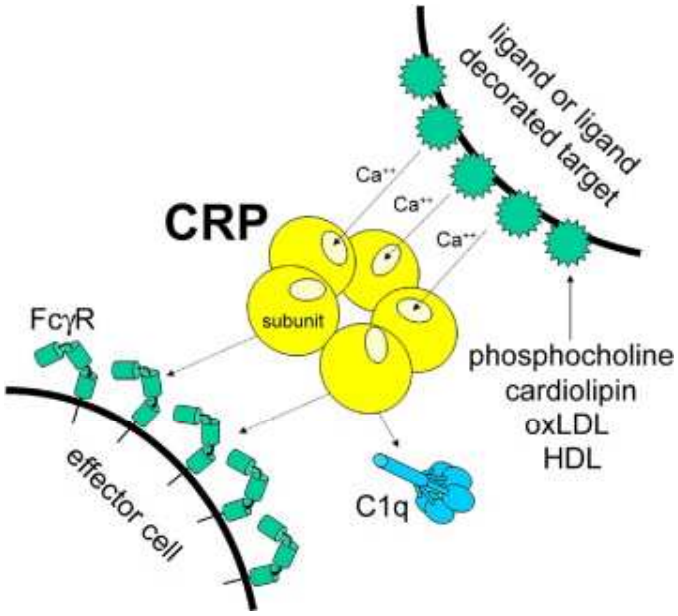

Abb. 6: Im Blut zirkuliert das C-reaktive Protein als Pentamer (41)

1.2.2 Polymorphismen im CRP-Gen

Während die CRP-Konzentration im Serum von Menschen nach einem entzündlichen Stimulus mit großer Dynamik und Spannweite auf Werte bis 500 mg/l und darüber hinaus ansteigen kann, (27) zeigen aktuelle Arbeiten, dass die basalen Konzentrationen dieses Proteins beim Menschen durchschnittlich bei 0,8 mg/l liegen (61). Selten können manche Personen aber auch basale Werte von 10 mg/l aufweisen (54). Welcher konkrete Ausgangswert in einem gesunden Individuum vorgefunden werden kann, wird von genetischen Faktoren bestimmt. In einer Untersuchung von MacGregor et al. korrelierten die CRP-Werte bei weiblichen monozygoten Zwillingen signifikant stärker als in zweieiigen Zwillingen (65). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser genetische Einfluss auf Polymorphismen im Gen des CRP oder in Genen, die die Expression dieses Proteins kontrollieren, zurückzuführen ist.

Bisher wurden zehn Polymorphismen beschrieben, (22) die einen Einfluss auf die CRP-Spiegel haben: Im Einzelnen sind diese SNPs in Tabelle 5 aufgeführt. Zee et al. (116) untersuchten die Auswirkungen des *CRP +1059*-Polymorphismus auf den CRP-Serumspiegel und das Risiko, eine arterielle Thrombembolie zu entwickeln.

12 % der untersuchten 726 gesunden Männer waren Träger des selteneren C-Allels und wiesen niedrigere CRP-Konzentrationen als G/G-homozygote Männer auf. Die vermutete Assoziation mit Thrombembolien konnte jedoch nicht bestätigt werden. Der *CRP +1059* SNP liegt laut Literaturangaben im zweiten Exon des CRP und ist eine stille Mutation (silent mutation). Dies bedeutet, dass die Mutation zu keinem Aminosäurenaustausch im Protein führt. Erst vor kurzem wurden im Third National Health and Nutrition Examination Survey weitere SNPs im CRP-Gen und ihre Auswirkungen auf den CRP-Serumspiegel analysiert. Bei 7159 untersuchten Individuen konnte nur ein Einfluss des *390C/T/A* SNP auf CRP-Serumspiegel *und* das Arteriosklerose-Risiko nachgewiesen werden (22).

Genregion	SNP Position	SNP	Relative Allelfrequenz	Mit höheren CRP-Spiegeln assoziiertes Nukleotid
Promoter	-757	rs3093059	T > C	T
	-717	rs2794521	T > C	T
	-409	rs3093062	G > A	G
	-390	rs3091244	C > T > A	A
Intron	+29	rs1417938	A > T	A
Exon 2	+1059	rs1800947	G > C	G
3´ UTR	+219	rs3093066	C > A	C
	+1444	rs1130864	C > T	C
3´ flanking	+1846	rs1205	C > T	C
	+2911	rs3093068	C > G	G

Tab. 5: Single Nucleotide Polymorphismen im Gen des CRP die Einfluss auf den CRP-Spiegel haben (22). UTR: Untranslated Region

.

Außerdem wurde bei gesunden männlichen Blutspendern, die Träger des *+1059 C*-Allel waren, signifikant niedrigere CRP-Spiegel als bei G/G-homozygoten gefunden. Allerdings konnte in der Gruppe der untersuchten Frauen kein entsprechender Unterschied festgestellt werden (34).

Trugen die G/G-homozygoten Männer aber zusätzlich das T-Allel des *IL1B +3954*-Polymorphismus, waren auch Ihre CRP-Spiegel durchschnittlich niedriger als in der

gesamten Studienpopulation. Anders formuliert: hatte ein Mann weder das C-Allel des *CRP +1059*-Polymorphismus noch das T-Allel des *IL1B +3954*-Polymorphismus, war er dem nahezu dreifachen Risiko ausgesetzt, erhöhte basale CRP-Spiegel zu haben (34). Daraus schlossen die Autoren, dass sowohl der *CRP +1059*- als auch der *IL1B(C→T)*-Polymorphismus Wirkung auf den CRP-Serumspiegel haben und diese unabhängig voneinander in männlichen Personen entfalten (34).

Ein weiterer Polymorphismus im CRP-Gen, die in der +1444-Region gelegene C → T Substitution, und deren Einfluss auf die Konzentration des CRP-Serumspiegels wurde in mehreren Studien gut charakterisiert. In einer Gruppe gesunder Probanden wiesen Personen mit dem homozygoten *+1444T/T*-Genotyp höhere Spiegel dieses Akuten-Phase Proteins auf als *+1444C*-Träger. Die Messungen wurden in Ruhe und nach sportlicher Anstrengung vorgenommen (18). Identische Ergebnisse wurden im gleichem Manuskript veröffentlicht, das die oben erwähnte Fragestellung, welchen Einfluss dieser Polymorphismus auf die CRP-Konzentration hat, auch bei Patienten untersuchte, die eine koronare Bypass-Operation hinter sich hatten: bei den *+1444T/T*-Homozygoten waren höhere CRP-Konzentrationen feststellbar (18). Die Annahme, dass der Haplotyp des CRP-Gens, der das *1444T* Alle enthält, mit erhöhten basalen CRP-Spiegeln assoziiert ist, wurde schließlich in einer weiteren Studie bestätigt. In dieser als Kohortenstudie angelegten Arbeit wurden an systemischen Lupus erythematodes (SLE) erkrankte Patienten und deren Familienmitgliedern untersucht (85). In der gleichen Untersuchung wurde eine weitere polymorphe Gensequenz in der 3´-untranslated region identifiziert und mit *CRP 4* benannt. Deren selteneres *CRP 4A*-Allel ist mit erniedrigten basalen CRP-Werten verknüpft. Der Einfluss des *–717G / A* SNP im Promoter des CRP-Gens auf die Serumkonzentrationen des CRP konnte jedoch in dieser Studie nicht bestätigt werden (85).

2 Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie die Bedeutung des *CRP +1059*-Polymorphismus beim M. Crohn untersucht werden. Bisher wurde dieser Polymorphismus nur hinsichtlich seiner Auswirkung auf den CRP-Serumspiegel untersucht. Andere Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen CRP-Spiegel und phänotypischer Ausprägung des M.Crohn. Folgende Fragestellungen lagen dieser Arbeit zu Grunde:

1. Welche Auswirkungen haben die verschiedenen Genotypen des *CRP +1059*-Polymorphismus im Gen des C-reaktiven Proteins auf die Krankheitssuszeptibilität des M. Crohn?
2. Inwieweit sind die verschiedenen +1*059 CRP*-Genotypen mit bestimmten Phänotypen dieser Erkrankung assoziiert?
3. Welchen Einfluß haben die verschiedenen *CRP +1059*-Genotypen auf den Serumspiegel des C-reaktiven Proteins?

3 Patienten, Methoden, Materialien

3.1 Patienten- und Kontrollgruppe

In diese Studie wurden 241 an M. Crohn erkrankte Patienten und 199 gesunde, nicht-verwandte Kontroll-Probanden eingeschlossen. Alle an dieser Studie teilnehmenden Personen haben nach ausführlicher Aufklärung über diese Studie schriftlich der wissenschaftlichen Auswertung ihrer Krankenakten und der molekularbiologischen Untersuchung ihres Blutes zugestimmt. Alle Studien-Teilnehmer waren mitteleuropäischer Abstammung. Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt.

Die an M. Crohn erkrankten Personen wurden in der CED-Ambulanz der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums München-Großhadern behandelt. Die Diagnose wurde nach anerkannten klinischen Richtlinien und endoskopischen, radiologischen und histopathologischen Kriterien gestellt (28). Patienten, die an einer Colitis indeterminata litten, wurden von dieser Studie ausgeschlossen. Die Schwere der Krankheit wurde nach der Vienna-Klassifikation (38) eingeteilt, die, wie oben dargestellt, die Charakteristika Alter bei Diagnosestellung (A), Verhalten (B) und Lokalisation (L) der Krankheit berücksichtigt. Demographische Daten und klinische Routineparameter der Patienten wurden von zwei unabhängigen Untersuchern retrospektiv aus Patientenakten und detaillierten Fragebögen ermittelt. Besonders wichtig waren hier eine genaue Medikamenten- und Familienanamnese, das Auftreten von Komplikationen oder extraintestinalen Manifestationen und operative Eingriffe, deren Ursache im Zusammenhang mit dem M. Crohn steht.

Die Probanden der Kontrollgruppe entstammen aus einem zu Forschungszwecken gebildeten Kontrollkollektiv des Instituts für Klinische Chemie der Universität München; auch die Mitglieder dieser Gruppe willigten in die wissenschaftliche Aufarbeitung ihrer DNA ein. Aus dieser DNA-Bank gesunder nicht-verwandter mitteleuropäischer Personen, die nach Geschlecht getrennt organisiert ist, wurde die Kontrollgruppe randomisiert ausgewählt.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolation der DNA aus Vollblut

Allen an dieser Studie teilnehmenden Personen wurde unter Verwendung des Sarstedt-Monovetten-Systems EDTA-Vollblut aus einer epifaszialen Vene abgenommen. Nun konnte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma QIAGEN und dem dazugehörigem Blood and Body Fluid Protocol die DNA der Probanden aus den peripheren Blutleukozyten isoliert werden. Hier wird in zehn Schritten aus 200 µl Vollblut ungefähr 6 µg gereinigte DNA, die frei von Proteasen, Nukleasen oder sonstigen Kontaminationen ist, gewonnen. Kernstück dieser Arbeitsschritte ist der Einsatz der QIAamp Spin Column; ein Plastikröhrchen mit einer trichterförmigen Öffnung am Boden, die mit einem Silikatkissen bedeckt ist. Auf dieser Membran wird die DNA in sequentiellen Arbeitsschritten zuerst gebunden und dann ausgewaschen. Die Spin Column kann in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt werden, so dass abzentrifugierte Flüssigkeiten aufgefangen werden können. Zunächst werden in einem Sammelröhrchen die Zellen in der Materialprobe mit 20 µl der Proteinase K lysiert und die DNA mit 200 µl Ethanol gefällt. Gutes Mischen mit dem Vortexer nach jedem Schritt ist sehr wichtig. Das Lysat wird in die Spin Column gegeben und mit einer Eppendorf-Mikrozentrifuge durch die Öffnung in ein weiteres Röhrchen abfiltriert. Die DNA ist jetzt an die Membran aus Silkat-Gel gebunden. In zwei weiteren Arbeitschritten wird durch Zugabe von je 500 µl der Puffer AW1 und AW2, die später abzentrifugiert werden, die Reinheit der DNA erhöht. Im letzten Schritt löst man mit 200 µl des Puffers AE die DNA nach Zentrifugation in ein 1,5 ml großes Eppendorf Gefäß auf. Die DNA, die man durch dieses Protokoll erhält, ist bis zu 50 kb lang, die meisten Stücke enthalten 20 – 30 kb. Diese Länge ist für die Amplifizierung bestimmter Fragmente besonders geeignet. Die gewonnene DNA wird bei 4℃ au fbewahrt.

Die zehn Arbeitsschritte des Blood and Body Fluid Spin Protocol (QIAamp DNA Blood Mini Kit)	
1.	20 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben.
2.	200 µl Materialprobe zugeben.
3.	200 µl Puffer AL zufügen. *15 s pulsierend vortexen.*
4.	Bei 56 ℃ 10 min inkubieren.
5.	Kurz zentrifugieren.
6.	In das Gefäß 200 µl 100%iges Ethanol pipettieren. *15 s Vortexen, kurz zentrifugieren*.
7.	Mischung in die QIAamp Spin Column geben. Diese in ein 2 ml Sammelgefäß stecken. *Bei 6000g 1 min zentrifugieren, das Filtrat im Sammelgefäß verwerfen.*
8.	500 µl Puffer AW1 in Spin Column geben, diese wiederum in Sammelgefäß stecken. *Bei 6000g 1 min zentrifugieren, das Filtrat im Sammelgefäß verwerfen.*
9.	Schritt acht mit 500 µl Puffer AW2 wiederholen. *Bei 6000g 1 min zentrifugieren, das Filtrat im Sammelgefäß verwerfen*
10.	Spin Column in 1,5 ml Reaktionsgefäß geben, in die Column 200 µl Puffer AE füllen. *1 min bei Raumtemperatur inkubieren, dann in das 1,5 ml Gefäß mit 600g zentrifugieren.*

Tab. 6: Arbeitsschritte zur Isolierung von DNA aus Vollblut. Bei angenommenen 5 x 10^6 Leukozyten/ml erhält man typischerweise 6 µg DNA in 200 µl Wasser.

3.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit der PCR

Die PCR wurde von Mullis 1986 (71) entwickelt und erlaubt es beliebige DNA-Sequenzen der Erbsubstanz gezielt und millionenfach zu kopieren. Als Vorlage reicht eine geringe Menge genomischer DNA (10^{-9}–10^{-12} g) aus. Um die zu replizierende Stelle zu markieren und somit den Wirkbereich der DNA-Polymerase zu definieren, werden komplementär zu den beiden 5´-Enden der Zielsequenz 15 – 25 Basen lange Oligonukleotide synthetisch hergestellt und im Überschuss in den Reaktionsansatz gegeben (sogenannte Primer). Beim Erreichen einer für den jeweiligen Primer optimalen Temperatur hybridisieren diese mit ihrem Gegenpart des zuvor bei 90℃ dena-

turierten und aufgespalteten doppelsträngigen Genoms. Dieser Vorgang wird auch Annealing genannt. Sobald der Ansatz auf die Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase abgekühlt ist, beginnt sie (von den Primern ausgehend), die DNA zu amplifizieren. Zuvor müssen der Polymerase im Reaktionsansatz eine genügend große Anzahl an dNTP-Molekülen angeboten werden. Der PCR-Cycler, in dem sich der Reaktionsansatz befindet, wiederholt diesen Arbeitszyklus in einer zuvor programmierten Anzahl. Heute verwendet man die hitzestabile, aus *Thermophilus aquaticus* isolierte Taq-Polymerase. In der ursprünglichen Arbeitsanweisung musste die bei 90℃ zerstörte Polymerase nach jedem Zyklus ers etzt werden.

Verwendete Primer	**Sequenz**
Forward Primer CRP–1059F	5´-GATCTGTGTGATCTGGAGAAACCTCT-3´
Reverse Primer CRP-1059R	5´-GAGGTACCAGAGACAGAGACGTG-3´

Tab. 7: **Verwendete Primer.** Je 15 pmol dieser Primer werden für einen Reaktionsansatz benötigt. Der Vorwärts-Primer ist 26 Basen lang, der Rückwärts-Primer enthält 23 Basen.

Der von uns verwendete Reaktionsansatz, sowie die genaue Anzahl und Abfolge der Arbeitsschritte, welchen der Ansatz im PCR-Cycler ausgesetzt war, können Tabelle 8 entnommen werden. Die gesamte Reaktion bestand aus 30 Zyklen gefolgt von zwei letzten Schritten: einer Denaturierung bei 95° C fü r drei Minuten und einer abschließenden Amplifikation bei 72° C für zwei Minuten. Di ese beiden Schritte stellen sicher, dass bisher unvollständig amplifizierte DNA-Stränge fertig gestellt werden.

Der PCR-Ansatz hat ein Gesamtvolumen von 50 µl und enthält:	
5 µl.....	DNA-Lösung
5 µl.....	Reaction Buffer
5 µl.....	dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5 µl.....	Q-Solution
1 µl……	CRP 1059F-Primer
1 µl……	CRP 1059R-Primer
0,25 µl……..	Promega Taq-Polymerase
27,75µl.....	H_2O

Die PCR-Reaktion besteht aus folgenden Zyklen:	
Amplifikation (30 Zyklen)	30 s 95°C Denaturierung 30 s 69℃ Annealing der Primer 30 s 72 ℃ Amplifikation
Letzte Denaturierung	3 min 95°C
Letzte Amplifikation	10 min 72°C

Tab. 8: PCR-Ansatz und PCR-Reaktion. Die letzten beiden Schritte der PCR-Reaktion dienen dazu unvollständig amplifizierte Stränge fertig zu stellen.

Das in dieser Arbeit hergestellte PCR-Produkt besteht aus 744 Basenpaaren. Die Originalsequenz findet sich im CRP-Gen auf Chromosom 1 und beginnt im einzigen Intron und endet im zweiten Exon des Gens. Um Verunreinigungen mit fremder DNA zu erkennen, hier kann sich die außerordentliche Fähigkeit der PCR genetisches Material zu vervielfachen rächen, wird in einem von dreißig parallel durchgeführten Ansätzen die 5 µl DNA durch die gleiche Menge H_2O ersetzt. Nur wenn in diesem Reaktionsgefäß keine DNA vervielfältigt wird, kann man mit genügender Sicherheit davon ausgehen, dass auch die restlichen Ansätze nicht verunreinigt sind.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion werden aus jedem Reaktions-Gefäß 10 µl des PCR-Produktes zusammen mit 2,5 µl Laufpuffer auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Mittels Gelelektrophorese und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid kann nun geprüft werden, ob die PCR korrekt abgelaufen ist. Eine gefärbte Bande im Lauffeld der Kontrolle weist auf eine Verunreinigung mit fremder DNA hin. In die Tasche dieses Kontrollfeldes wird, wie oben erwähnt, statt der DNA eines Probanden nur H_2O pippetiert. Ein typisches Bild der Kontrolle der PCR-Produkte zeigt Abbildung 7.

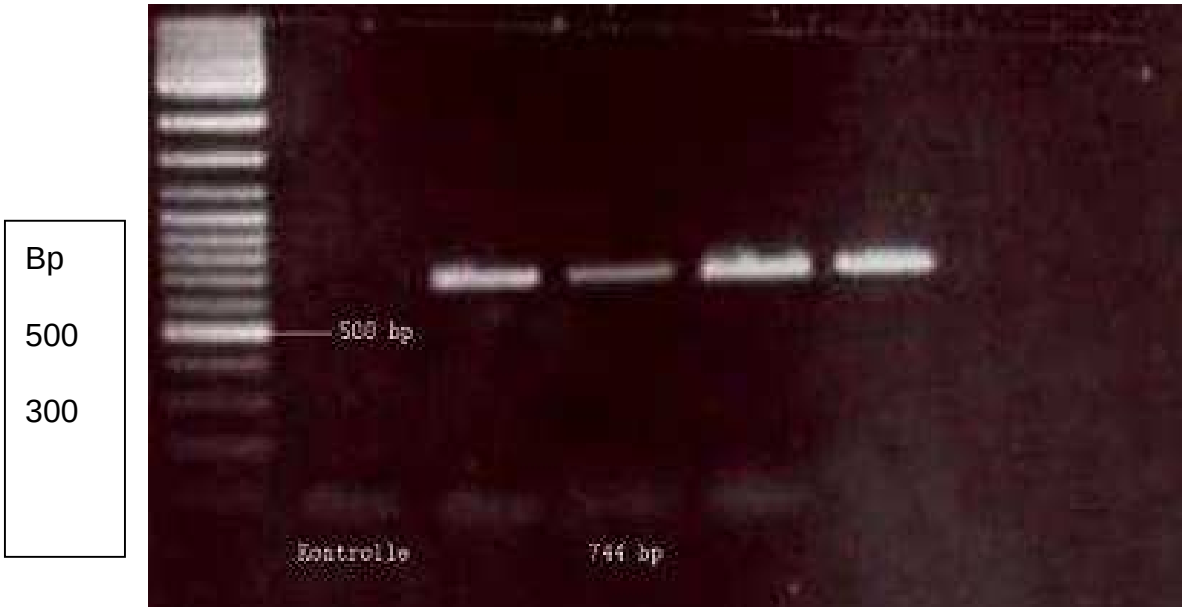

Abb. 7: Kontrolle der PCR-Produkte. Ganz links ist ein Größenstandard zu erkennen. An zweiter Stelle wurde eine H_2O-Kontrolle aufgetragen, gefolgt von vier amplifizierten Fragmenten mit 744 bp.

3.2.3 Reinigung des PCR-Produkts

Mit dem QIAquick Nukleotide Removal Kit kann das PCR-Produkt von kontaminierenden Substanzen gereinigt werden. Die genomische DNA kann so aus dem Ansatz entfernt werden. Wir verwendeten das PCR Purification KIT Protocol, entsprechend der vom Hersteller im QIAquick Spin Handbook aufgeführten Anleitung. Unter den möglichen Protokollen wurde das gewählt, das den Gebrauch einer Mikrozentrifuge vorschreibt.

3.2.4 Digestion der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die bestimmte Basenabfolgen in der DNA erkennen und an einer definierten Stelle zerschneiden können, so dass anhand der Schnittstelle bestimmte Polymorphismen identifiziert werden können. Die Schnittstelle des ausgewählten Enzyms muss an der Stelle des Polymorphismus liegen, an der ein Basenaustausch stattfindet. Dann kann anhand der Größe der sich ergebenden DNA-Fragmente entschieden werden, ob die untersuchte Person Träger des Wildtyp-Allels ist, oder ob hier eine Mutation stattfand. Im Fall des *CRP +1059* SNP wird das Guanosin des Wildtyps in 10% der Bevölkerung durch ein Cytosin ersetzt. Das aus Methanococccus aeolicus isolierte Restriktionsenzym Mae III ist in der Lage, die genomische DNA spezifisch an dieser Stelle aufzuspalten (Tab. 9).

Schnittstelle Mae III
↓GTNAC CANTG↑

Tab. 9: Schnittstelle des Enzyms Mae III.

Um die amplifizierte 744 bp lange DNA mit Mae III zu verdauen, muss das PCR-Produkt am Boden des Reaktionsgefäßes präzipitiert werden. Zu diesem Zweck werden in die anfänglichen 50 µl gelöster DNA-Fragmente 2,5 µl einmolare NaCl-Lösung gegeben, wodurch die Nukleinsäuren gefällt werden, da ihre positiv geladenen Phosphatgruppen an negativ geladene Salzionen binden. Bei diesem Schritt werden 125 µl 100%iges Ethanol dazu pipettiert; dies führt zum Wasserentzug und damit zur Präzipitation. Vortexen und 30 minütiges Kühlen bei –80° C sind die nächsten Arbeitsschritte. Danach wird die Lösung weitere 30 Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgekippt. Zu dem übrig gebliebenen DNA-Pellet am Boden des Röhrchens wird die Restriktionsendonuklease Mae III gegeben (für die genaue Arbeitsanweisung siehe Tab. 10).

Der Verdau erfolgte bei 55° C für mindestens 16 h (über Nacht). Für den Fall des selteneren *+1059C*-Allels schneidet das Enzym das PCR-Produkt an einer konstanten Schnittstelle in ein 310- und ein 434-Basenpaare langes Stück.

Der Verdau des PCR-Produkts geschah in diesem Ansatz mit 10 µl Gesamtvolumen:	
5 µl	2fach konzentrierter Inkubationspuffer
1 µl	Mae III Restriktionsenzym (1 – 5 U/µl)
4 µl	H_2O
Verdau für mindestens 16h (über Nacht) bei 55°C	

Tab. 10: **Ansatz zum Verdau des PCR-Produkts mit Mae III**. Die DNA ist als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes präzipitiert und muss durch vorsichtiges Schütteln mit dem Ansatz vermischt werden

Das häufigere *+1059 G*-Allel wird an einer zusätzlichen Schnittstelle in insgesamt drei Fragmente geschnitten, die jeweils 310, 233 und 201 Basen lang sind. Die drei möglichen Genotypen des *CRP +1059G/C* SNP lassen sich also wie folgt charakterisieren:

- Der Wildtyp mit zwei *CRP +1059* G-Allelen zeigt sich durch drei Fragmente, die 310, 233 und 201 Basenpaare messen.
- Heterozygote Patienten mit einem *CRP +1059*-C Allel weisen vier Stücke auf, die 434, 310, 233 und 201 Basenpaare lang sind.

- Bei homozygoten Patienten mit zwei *CRP +1059* C-Allelen finden sich nur zwei Stücke mit einer Größe von 434 und 310 Basenpaaren.

Die Größe der Fragmente, die sich in einem Ansatz durch den Verdau ergeben haben, werden mittels Gelelektrophorese und einem mitlaufenden Größenstandard ermittelt.

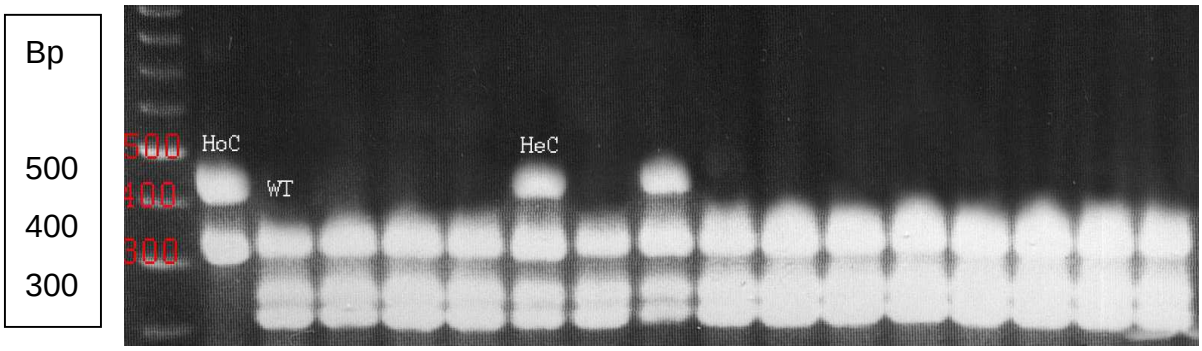

Abb. 8: **Die drei möglichen Genotypen des *CRP +1059* SNP**. Ein homozygoter Patient mit dem *+1059C/C*-Genotyp (HoC) und zwei Heterozygote (HeC) mit einem G/C-Genotyp an dieser Stelle. 14 Patienten weisen den G/G-Wildtyp (WT) auf. Ganz links sieht man den Größenstandard, die Zahlen stehen für die jeweilige Anzahl an Basenpaaren die der Größenstandard an dieser Stelle darstellt. Die unterste Einteilungsmarke, die 100 bp entspricht, ist auf diesem Bild abgeschnitten, im Original aber zu erkennen.

3.2.5 Analyse der Restriktionsfragmente mit der Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine weitere Standardmethode der Molekularbiologie, um DNA-Stücke verschiedener Größe zu trennen, sichtbar zu machen, und mit Hilfe eines Größenstandards, der parallel zu den verdauten Ansätzen im Gel durch das elektrische Feld aufgetrennt wird, die Anzahl der enthaltenen Basen abschätzen zu können. Die verdauten PCR-Ansätze werden mit 1,5 µl Laufpuffer versetzt und jeder in eine der Taschen an der breiten Basis des Gels gegeben, das in unserem Fall 2% Agarose enthält. Zuvor wird das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TBE-Puffer übergossen. Die von uns verwendeten Gele haben 19 dieser Taschen; in die erste wird der Größenstandard, die sogenannte Molecular Ladder, gegeben. Die vollständige Auftrennung der negativ geladenen DNA benötigt bei 40 mV ungefähr zwei Stunden. Längere Fragmente legen aufgrund ihrer größeren negativen Ladung in einer Zeiteinheit größere Strecken zurück als kürzere. Anschließend wird das Gel für 10 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gelegt, die mit der DNA interkaliert. Dadurch kann im ultravioletten Licht die gefärbte DNA sichtbar gemacht und photogra-

phisch dokumentiert werden; aus diesen Fotos kann der CRP-Genotyp der Studienteilnehmer bestimmt werden.

3.2.6 Genotypisierung der *NOD2/CARD15*-Varianten

Die Genotypisierung der drei mit M. Crohn assoziierten Gen-Varianten der Caspase-activation recruitment domain (*NOD2/CARD15*) wurde von Herrn Dr. med. Fabian Schnitzler durchgeführt und 2005 veröffentlicht (93). Zur zusätzlichen Analyse potentieller Interaktionen zwischen dem CRP-Gen und dem *NOD2/CARD15*-Gen wurden mir diese Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Exons 4, 8, und 11 des Gens *NOD2/CARD15* wurden amplifiziert und wie dort beschrieben sequenziert. Diese Sequenzen wurden mit dem ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) auf dem Sequence Analysis program (Version 3.4.5) analysiert.

3.2.7 Bestimmung der CRP-Konzentration im Serum

Das Serum zur Bestimmung des CRP-Wertes wurde den Patienten am selben Tag entnommen wie das Vollblut zur Genotypisierung des *+1059 CRP* SNP. Allen Patienten wurde zuvor im Rahmen ihrer Behandlung ein Tagebuch ausgehändigt, mit dessen Hilfe wöchentlich der CDAI bestimmt werden konnte. Diejenigen Personen, die innerhalb der letzten sieben Tage vor der Blutentnahme ihr Tagebuch unvollständig geführt hatten oder andere Gründe anführten, die eine Berechnung des CDAI an diesem Tag nicht erlaubten, wurden von der Analyse der CRP-Werte ausgeschlossen. Insgesamt konnte der CDAI von 133 Patienten bestimmt werden. Die CRP-Konzentrationen dieser Individuen wurde mit einem hoch sensitiven Immunoassay der Firma Behring (N Latex CRP mono, Dade Behring, Behring Laser Nephelometer) im Labor für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Großhadern bestimmt. Die breit variierenden CDAI-Werte wurden nach der oben erwähnten Einteilung, die sich in anderen Studien bewährt hat (72), in ruhende Erkrankung (CDAI < 150), aktive Erkrankung (CDAI von 150 bis 300) und schwerer Krankheitsschub (CDAI > 300)

klassifiziert. Da die Serumkonzentration des CRP naturgemäß von der Aktivität des M. Crohn beeinflusst wird, wurde der CDAI in die statistische Analyse mit einbezogen.

3.2.8 Statistische Methoden

Kategoriale (qualitative) Variablen wurden je nach Anwendbarkeit mit Fisher´s exact test oder dem Chi^2-Test verglichen. Für kontinuierliche (quantitative) Variablen kam der U-Test von Mann und Whitney zum Einsatz. Relative Risiken wurden als Odds-Ratio in SPSS berechnet, zur genaueren Beurteilung eines möglicherweise signifikanten Zusammenhangs wird ferner das 95%-Konfidenzintervall angeführt. Die Trennschärfe oder auch Power eines Testes konnte mit der PS: Power and Sample Size Calculation Software berechnet werden. Alle Teste wurden als zweiseitiger (two-tailed) Test durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als signifikant definiert. Die Stärke von linearen Zusammenhängen konnte durch Berechnung des linearen Regressionskoeffizienten nach Pearson mit Excel 2000 für Windows ermittelt werden. Um den Einfluss des CRP-Polymorphismus auf die von uns erhobenen phänotypischen Charakteristika der Patienten zu bestimmen, wurde zuerst eine Univarianz-Analyse durchgeführt. Der explorative Charakter dieser Studie bewog uns dazu keinen Korrekturfaktor für multiple Teste einzuführen. Um mögliche Einflussgrößen zu demaskieren, die eine Assoziation des CRP-Polymorphismus mit einem bestimmten Phänotyp des M. Crohn vortäuschen, wurde zusätzlich eine logistische Regressions-Analyse durchgeführt, die den Effekt der drei *NOD2/CARD15*-Varianten, des Alters, die bisherige Dauer der Erkrankung und das Geschlecht mit einbezog. Prädiktoren wurden mit der „forward selection“ identifiziert, die auf dem Wald-Test beruht. Als Signifikanzniveau für Faktoren, die in dieses Modell Eingang fanden wurde $\alpha \leq 0{,}05$ definiert. Für diese logistische Regressions-Analyse wurde die Software SAS 9.1 für Linux (SAS Institute, Cary, NC, USA) verwendet.

3.3 Materialien

3.3.1 Chemikalien

Die experimentellen Untersuchungen wurden mit folgenden Chemikalien der jeweils nebenstehenden Hersteller durchgeführt:

Produkt:	Hersteller, Firmensitz:
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CRP 1059F, Forward-Primer	Roche Biotechnologies, Basel
CRP 1059R, Reverse-Primer	Roche Biotechnologies, Basel
Didesoxynukleotide	Pharmacia Biotech, Freiburg
DNA molecular weight marker (1kb ladder)	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ficoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Inkubationspuffer (Mae III)	Roche Biotechnologies, Basel
Na_2EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
QIAamp DNA Blood Mini Kit: Proteinase K Puffer AE Puffer AL Puffer AW 1 Puffer AW 2	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit Puffer PE Puffer PB	QIAGEN, Hilden
Q-Solution	Abgene, Hamburg
Reaction Buffer	Abgene, Hamburg
Restriktionsenzym MaeIII	Roche Biotechnologies, Basel
Taq-Polymerase	Promega, Madison, USA
Tris	Merck, Darmstadt

Tab. 11: Verwendete Chemikalien und Substanzen

3.3.2 Geräte

Die nachstehenden Laborgeräte kamen bei den Untersuchungen zum Einsatz:

Gerät	Hersteller, Firmensitz
Elektrophoresekammern	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Heizblock	Lab Line Instuments Inc., Melrose Park, USA
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Oligo-Synthesizer	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler	Biozym, Hessisch Oldendorf
Tischwaage	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg
Vakuumzentrifuge	Bachofer, Reutlingen

Tab. 12: Verwendete Geräte

4 Ergebnisse

4.1 Demographische Merkmale der Studienpopulation

In diese Studie wurden 241 Patienten und 199 Kontrollprobanden eingeschlossen. Die demographischen Merkmale dieser Studienpopulation werden in Tabelle 13 aufgeführt. Der Anteil männlicher und weiblicher Studienteilnehmer ist in der Patienten und Kontrollgruppe nahezu gleichverteilt (48,5% männliche an M. Crohn erkrankte und 50,3% gesunde Männer). Mit einem durchschnittlichen Alter von 46,4 Jahren sind die Mitglieder der Kontrollgruppe im Schnitt 6,7 Jahre älter als die M. Crohn-Patienten. In der Familiengeschichte der Patienten kann in 36 (13%) Fällen eine Erkrankung an M. Crohn bei Verwandten ersten und zweiten Grades dokumentiert werden. Eindeutige Angaben fehlten bei 22 (9,9%) Personen. Keiner der Kontrollprobanden hat an M. Crohn erkrankte Verwandte. Weitere Angaben, die der Tabelle 13 entnommen werden können, wie das durchschnittliche Alter der Patienten bei Diagnosestellung und die durchschnittliche Krankheitsdauer, werden in den nachfolgenden Kapiteln analysiert.

4.2 Die Vienna-Klassifikation

Nach der Vienna-Klassifikation (38) konnte, wie weiter oben ausführlich beschrieben, jeder Crohn-Patient unter Berücksichtigung der Merkmale Alter (A), Lokalisation (L) und Verhalten (B) in eine von 24 Untergruppen eingeteilt werden. Wie sich diese 241 Patienten auf diese Subtypen des M. Crohn verteilen, ist aus Tabelle 15 ersichtlich. Die weitaus größte Untergruppe mit den Merkmalen Lokalisation in Ileum und Kolon (L3), einem penetrierenden und fistulierenden Phänotyp (B3), und der ersten Diagnose der Krankheit vor dem 40. Lebensjahr beinhaltet 67 (27,8%) Patienten. Am zweithäufigsten, nämlich 27 (11,2%) mal, tritt in der Patientengruppe der Subtyp auf, der ebenso durch Lokalisation im Kolon und Ileum charakterisiert ist (L3), einen stenosierenden Phänotyp (B2), und die erstmals gestellte Diagnose vor Vollendung der vierten Dekade (A1) aufweist. Die 22 (9,1%) Patienten fassende, drittgrößte Untergruppe definiert sich durch die Krankheitslokalisation im Kolon (L2), weist aber ansonsten mit dem schweren Phänotyp B3 und der frühen Diagnosestellung (A1) die Merkmale der größten Untergruppe auf.

	MC (n = 241)	**Kontrollgruppe** (n=199)
Geschlecht		
Männlich	117 (48,5 %)	100 (50,3 %)
Weiblich	124 (52,5 %)	99 (49,7 %)
Alter		
Durchschnitt +/- SD	39,7 +/- 12,3	46,4 +/- 15,2
Spannweite (Range)	16 – 74	21 – 84
Alter bei Diagnosestellung		
Durchschnitt +/- SD	27,7 +/- 11,7	
Spannweite (Range)	7 – 71	
Median	24	
Bisherige Krankheitsdauer		
Durchschnitt +/- SD	11,6 +/- 8,2	
Spannweite (Range)	1 – 43	
Median	9	
MC Familienanamnese		
Positiv	36 (13 %)	0 (0 %)
Negativ	183 (76,7 %)	199 (100 %)
Nicht bekannt	22 (9,9 %)	

Tab. 13: **Demographische Merkmale der Studienpopulation**. Alter, Alter bei Diagnosestellung und bisherige Krankheitsdauer sind in Jahren angegeben.

Der im Durchschnitt sehr frühe Krankheitsbeginn (27,7 +/- 11,7 Jahre) kann aus den Tabellen 13 und 14 ersehen werden und findet Ausdruck in den 84,2% der Patienten, deren Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr diagnostiziert wurde (Vienna A1). Tabelle 14 und 15 beschreiben diese Patientengruppe als eine Kohorte mit phänotypisch überwiegend schwerer Erkrankung. 54,8 % der Patienten haben eine penetrierende Erkrankung (Vienna B3), während 25,7% der Erkrankten an einer Stenose leiden, aber keine zusätzliche Penetration des Gastrointestinaltraktes aufweisen (Vienna B2). Jeweils mindestens die Hälfte der Patienten hatten den Krankheitsbeginn vor dem 40sten Lebensjahr. Die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug 11,6 Jahren.

Die Häufigkeit mit der die Komplikationen eines M. Crohn, wie Fisteln, Abszesse, Stenosen und Strikturen in der Patientengruppe auftraten, ist in Tabelle 14 aufgeführt. Auch die Anzahl der Patienten, die an mindestens einer extraintestinalen Manifestation des M. Crohn litten, wird hier ersichtlich. Zudem wird deutlich, dass die meisten Patienten im Laufe ihrer Erkrankung schon einmal mit Immunsupressiven Medikamenten behandelt wurden. Im Vorgriff auf die nächsten Kapitel werden die Angaben in dieser Tabelle schon nach dem *CRP +1059*-Genotyp der Patienten aufgeschlüsselt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird darauf verzichtet diese Daten zusätzlich für die Gesamtpopulation der Patienten darzustellen.

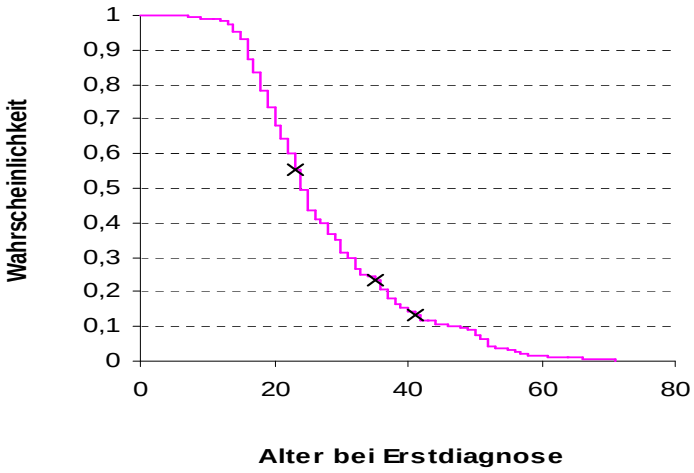

Abb. 9: Alter bei Erstdiagnose im Patientenklientel. Dargestellt als Kaplan-Maier Analyse

4.3 Häufigkeitsverteilung des *CRP +1059*-SNP in Patienten- und Kontrollgruppe

Wie sich die drei Genotypen des *CRP +1059*-Polymorphismus auf diese 241 M. Crohn-Patienten und 199 Kontrollprobanden verteilen wird in Tabelle 16 ersichtlich. Die Verteilung der Genotypen weist keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen Gruppen auf. Zudem liegen die gefundenen Häufigkeiten nah an den Erwartungswerten, die das Hardy-Weinberg-Gesetz, ausgehend von einer Allel-Frequenz von 10.9%, wie von Cao und Hegele (19) beschrieben, vorgibt.

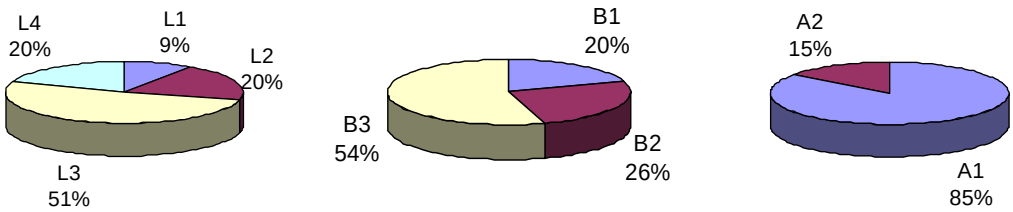

Abb 10. Die Verteilung der 241 Crohn-Patienten auf die Parameter der Vienna-Klassifikation

	(1) G/G WT (n = 219)	(2) G/C HeZ (n = 17)	(3) C/C HoZ (n=5)	(1) vs. (2) P- Wert	(1) vs. (3) P- Wert	(2) vs. (3) P - Wert	(1) vs. (2+3) P - Wert
Männlich							
n (%)	107 (48.9%)	9 (52,9%)	1 (20%)	0,805	0,371	0.323	0,825
BMI							
Durchschnitt +/- SD	23,0 +/- 4,0	24,9 +/- 3,3	21,0 +/- 2,7	0,043	0,2194	0,032	0,231
Spannweite (Range)	16 – 40	20 - 30	18 - 24				
Alter bei							
Diagnosestellung							
Durchschnitt +/- SD	27,7+/- 11,9	28,1 +/- 10,6	27,8 +/- 8,8	0,884	0,974	0,957	0,883
Spannweite (Range)	7 – 71	15 - 52	18 - 37				
Krankheitsdauer							
Durchschnitt +/- SD	11,7 +/- 8,2	10,5 +/- 8,5	8,2 +/- 9,0	0,587	0,435	0,624	0,374
Spannweite (Range)	1 – 43	2- 25	2 - 24				
Alter bei							
Diagnosestellung							
< 40 Jahre (A1)	185 (84,5%)	13 (76,5%)	5 (100%)	0,489	1,000	0,535	0,759
> 40 Jahre (A2)	34 (16,4%)	4 (23,5%)	0				
Krankheitslokalisation							
Terminales Ileum (L1)	16 (7,3%)	4 (23,5%)	2 (40,0%)	0,044	0,053	0,585	0,008
Kolon (L2)	46 (21,0%)	0	1 (20%)	0,050	1,00	0,227	0,087
Ileokolon (L3)	112 (51,1%)	11 (64,7%)	2 (40%)	0,322	0,679	0,609	0,510
Oberer GI-Trakt (L4)	45 (20,6%)	2 (11,8%)	0	0,536	0,586	1,000	0,265
Jeder MC-Befall des Ileum[a]	163 (74,4%)	17 (100%)	4 (80%)	0,015	0,651	1,000	0,032
Verhalten[b]							
Keine Strikturen, Keine Penetration (B1)	40 (18,3%)	6 (35,3%)	1 (20%)	0,109	1,000	1,000	0,155
Mit Strikturen (B2)	60 (27,4%)	1 (5,9%)	1 (20,0%)	0,080	1,000	0,411	0,074
Penetrierend (B3)	119 (54,3%)	10 (58,8%)	3 (60,0%)	0,804	1,000	0,411	0,074
Fisteln	120 (54,8%)	10 (58,8%)	3 (60,0%)	0,805	1,000	1,000	0,823
Stenosen/Strikturen	120 (54,8%)	10 (58,8%)	3 (60,0%)	0,176	0,641	1,000	0,154
Abszesse	82 (37,4%)	4 (23,5%)	2 (40,0%)	0,304	1,000	0,585	0,487
Operationen (wg. MC)[c]	129 (58,9%)	8 (47,1%)	3 (60,0%)	0,445	0,647	0,586	0,498
Extraintestinale Manifestationen[d]	154 (70,3%)	10 (58,8%)	4 (80,0%)	0,412	1,000	0,613	0,627
Pos. Fam.anamnese	35 (16,0%)	1 (5,9%)	0	0,482	1,000	1,000	0,214
Immunsppressive Medikation[e]	180 (82,2%)	15 (88,2%)	3 (60 %)	0,744	0,227	0,210	1,000

Tab. 14: Zusammenhänge zwischen den Genotypen des *CRP +1059* SNP und den Krankheitseigenschaften der 241 M. Crohn Patienten. WT: Wildtyp, HeZ: Heterozygot, HoZ: Homozygot. [a] Die Kategorie „Jeder M. Crohn Befall des terminalen Ileum“ schließt alle Patienten der Gruppen L1 und L3 ein. Zusätzlich wurden 35 G/G Wildtypen und zwei G/C Heterozygote hinzugezählt, die einen L4-Phänotyp aufwiesen und gleichzeitig einen Befall des terminalen Ileum hatten. [b]Das Verhalten (Behaviour) wurde nach der Vienna-Klassifikation (38) eingeteilt. Der stenosierende Phänotyp definiert sich durch eine Stenose ohne zusätzliche Penetration. Die Stenosen wurden chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch (MRI-Enteroklysma) festgestellt. [c]Nur Operationen, die sich durch Komplikationen des MC begründen (z.B.: Kolektomie, Anlage eines Ileostoma), wurden gezählt. Zu den extraintestinalen Manifestationen der CED zählen: nicht durch Medikamente verursachte Arthropathien (z.B.: Ankylosierende spondylitis, Sakroiliitis), Beteiligung der Augen (z.B.: Episkleritis, Iritis/Uveitis), Hautbeteiligung (z.B.: Erythema nodosum), Gallengangskrankheiten, die nicht Medikamenteninduziert sind. (z.: Sklerosierende Cholangitis).

[e]Zu den Immunsuppressiva gehören: Azathioprin, 6- Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und Infliximab.

Auffällig sind aber die fünf homozygoten Träger des selteneren C-Allels in der Gruppe der Patienten. Dagegen wurde in der Kontrollgruppe kein Träger dieses Genotyps gefunden (p = 0,066). Davon abgesehen ähnelt sich die Aufteilung der übrigen Varianten des *CRP +1059 SNP* in Patienten- und Kontrollgruppe mit 219 (90,9%) Wildtypen (G/G) in der Patienten- und 185 (93,0%) in der Kontrollgruppe. Auch der Anteil von Patienten, die einen heterozygoten Genotyp (G/C) an der Stelle des CRP +1059 SNP aufwiesen, ist mit 17 Crohn-Patienten (7,1%) und 14 Patienten (7,0%) in Fall- und Kon trollgruppe nahezu identisch.

	B1		**B2**		**B3**		
L1	9	7	3	2	10	8	A1
		2		1		2	A2
L2	16	11	4	3	27	22	A1
		5		1		5	A2
L3	15	11	35	27	75	67	A1
		4		8		8	A2
L4	7	6	20	20	20	18	A1
		1		0		2	A1

Tab. 15.: Verteilung der 241 Patienten auf die 24 Untergruppen der Vienna-Klassifikation

Genotyp des CRP +1059 SNP	**Morbus Crohn (*n* = 241)**	**Kontrollen (*n* =199)**	**P – Wert**
G/G (Wildtyp)	219 (90,9%)	185 (93,0%)	0,486
G/C(Heterozygot)	17 (7,1%)	14 (7,0%)	1,00
C/C (Homozygot)	5 (2,1%)	0 (0%)	0,066

Tab. 16.: Verteilung der drei möglichen Genotypen des *CRP +1059* SNP auf Fall und Kontrollgruppe

4.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Wie schon weiter oben erwähnt, zeigt Tabelle 14 wesentliche Krankheitscharakteristika der Patienten mit einem Wildtyp, einem hetero- oder homozygoten Genotyp des *CRP +1059*-Polymorphismus. Die Merkmale immunsuppressive Medikation, extraintestinale Manifestationen und andere Komplikationen des M. Crohn wie Abszess- und Fistelbildung, lassen in der Häufigkeit ihres Auftretens keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen drei Patientengruppen erkennen.

Anderes gilt hingegen für die Häufigkeitsverteilung der Krankheitslokalisationen L1 bis L4 nach der Vienna-Klassifikation: In der durch zwei G-Allele definierten Gruppe der Wildtypen weisen 128 von 219 Patienten (58,4%) den Phänotyp L1 oder L3 auf, von 17 heterozygoten G/C-Trägern weisen diesen Phänotyp 15 Personen auf (88,2%), ebenso vier der fünf C/C-homozygoten Patienten (80%; OR 4,55; 95% CI 1,64-16,67; P = 0,008 für C/C und C/G vs. G/G). Zusätzlich konnte bei 35 der 45 (77,8%) Erkrankten mit einem Wildtyp und einem L4-Phänotyp (Befall des oberen Gastrointestinaltraktes) eine Einbeziehung des terminalen Ileums festgestellt werden. Gleiches trifft für alle zwei Patienten mit einem heterozygoten Phänotyp zu. Bei den Personen mit zwei C-Allelen findet sich kein Individuum mit einem L4-Phänotyp. Stellt man nun in der Gruppe der Patienten deren Ileum von M. Crohn betroffen ist (L1 und L3-Phänotyp, Patienten mit L4-Phänotyp und ilealem Befall) G/G Wildtyp-Patienten und C/G-heterozygote gegenüber, finden sich auch hier signifikant mehr Patienten mit diesen Merkmalen bei den Trägern eines C-Allels (p = 0,015; Tabelle 14). Ähnliche Ergebnisse liefert die oben genannte Gruppe bei einem Vergleich der Wildtypen mit den restlichen Patienten, die mindestens ein C-Allel aufwiesen. Auch hier ist der Anteil der Personen mit einem Krankheitsbefall des Ileums signifikant größer bei den Patienten, die ein Cytosin im *CRP +1059 SNP* haben. Abbildung 11 gibt einen Überblick über das relative Risiko, dem eine an M. Crohn erkrankte Person unterliegt, abhängig von ihrem *CRP +1059*-Genotyp eine bestimmte Krankheitslokalisation, klassifiziert nach Vienna, zu haben.

In das, in diesem Abschnitt gezeichnete Bild einer signifikanten Häufung von G/C-heterozygoten und C/C-homozygoten in der Gruppe der Patienten mit Befall des Ileums fügt sich, dass keiner der G/C-heterozygoten Patienten einen isolierten Befall des Kolons aufweist (Phänotyp L2 nach der Vienna-Klassifikation), während dies bei 21,0% der Patienten mit zwei G-Allelen der Fall war (p = 0,05, Tabelle 13).

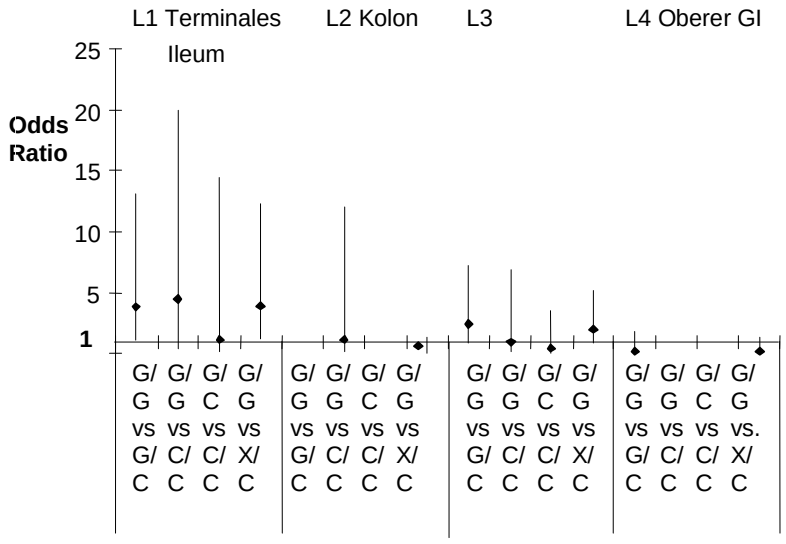

Abb.11: Relatives Risiko, dem ein Patient mit *CRP +1059* G/G-Wildtyp , G/C-heterozygotem oder C/C-homozygotem Genotyp unterliegt, eine bestimmte Krankheitslokalisation L1 bis L4 nach der Vienna-Klassifikation zu entwickeln. X/C fasst Patienten mit mindestens einem C-Allel zusammen. Die vertikalen Linien stellen das 95% CI-Intervall dar.

4.5 CRP-Serumspiegel, Krankheitsaktivität und *CRP +1059*-Genotyp.

4.5.1 CRP-Konzentration und Krankheitsaktivität

Im nächsten Schritt haben wir den Einfluss des *CRP +1059* SNP auf die CRP-Konzentration im Serum der Patienten untersucht. Da dieser maßgeblich von der aktuellen Krankheitsaktivität des Morbus Crohn mit beeinflusst wird, haben wir den Crohn´s Disease Activity Index der Patienten zum Zeitpunkt der laborchemischen CRP-Messung bestimmt. Unser Vorgehen hierbei wird im Kapitel 3.2.7 „Bestimmung der CRP-Konzentration im Serum“ näher erläutert. Letztendlich waren von 133 der 241 Patienten, deren Genotyp des *CRP+1059* SNP bestimmt wurde, CRP- und korrespondierende CDAI-Werte verfügbar. Ausgehend von den jeweiligen CDAI-Werten wurden diese 133 Patienten, die in diese Analyse eingeschlossen werden konnten, in drei Gruppen eingeteilt:

1. CDAI < 150, keine aktive Erkrankung, Remission.
2. CDAI 150 –300, moderate Krankheitsaktivität.
3. CDAI > 300, aktive Erkrankung, schwerer Schub.

Wie sich die Patienten auf diese drei CDAI-Klassen verteilen, zeigt Tabelle 17. Der Effekt der Krankheitsaktivität auf die CRP-Spiegel ließ sich deutlich nachweisen: der

Vergleich der durchschnittlichen CRP-Spiegel in den drei Gruppen zeigte einen Anstieg mit der Schwere der Krankheitsaktivität. Abbildung 14 führt dies deutlich vor Augen. Die Mittelwerte der Patienten in den Gruppen CDAI < 150 und CDAI 150 – 300 unterscheiden sich signifikant voneinander (p = 0,001); auch die Fraktionen CDAI 150 – 300 und CDAI > 300 erfüllen dieses Kriterium (p = 0,018). Ein Patient mit moderater Krankheitsaktivität (CDAI 150 –300) wies einen CRP-Wert von 15,9 mg/dl auf und liegt damit 8,1 mg/dl über dem zweithöchsten Wert dieser Gruppe. Bleibt dieser Ausreißer bei der Vergleichsprüfung der CRP-Spiegel in den CDAI-Gruppen aber unberücksichtigt, unterscheiden sich die nun gefundenen P-Werte erst an der dritten Stelle hinter dem Komma von den zuerst berechneten. Dieser Wert verfälscht das Ergebnis also nicht.

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson, der es erlaubt, die Stärke eines linearen Zusammenhangs zu quantifizieren, zeigt eine positive Korrelation von Krankheitsaktivität und Serumspiegeln des C-reaktiven Proteins in der gesamten Patientengruppe (r = 0,54). Die isolierte Betrachtung der einzelnen Genotypen des *CRP +1059* SNP zeigte die stärkste Korrelation dieser beiden Merkmale bei den C/C–homozygoten (r = 0,97). Patienten mit hoher Krankheitsaktivität haben also höhere CRP-Spiegel als Patienten mit ruhender Erkrankung. Die Werte der G/C-heterozygoten (r = 0,49) und der Wildtypen (r = 0,51) unterscheiden sich nur geringfügig von dem Koeffizienten der gesamten Patientenpopulation. In diesen beiden Gruppen ist also eine Korrelation von CRP-Speigel und CDAI erkennbar, diese ist aber weniger stark als in der Gruppe der C/C-homozygoten Patienten.

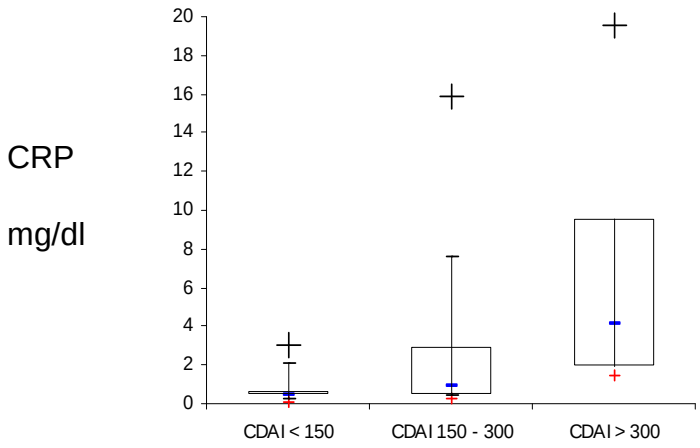

Abb. 12: **Streuung der CRP-Werte in den einzelnen CDAI-Klassen.** Dargestellt als Box and Whiskers-Diagramm.

4.5.2 CRP-Konzentration und *CRP +1059*-Genotyp

Eine genauere Aufschlüsselung der CRP-Spiegel von Patienten Krankheit in Remission (CDAI < 150 Punkte) zeigte, dass die Patienten mit einem *CRP +1059*-Wildtyp im Mittel die höchsten Werte aufweisen, C/C-homozygote die niedrigsten Werte, während die Durchschnittswerte der heterozygoten zwischen diesen beiden liegen. Die Differenz der Mittelwerte von Patienten mit einem Wildtyp und Patienten mit zwei *CRP +1059*C-Allelen ist signifikant (p < 0,001). Diese Gegebenheiten werden in Abbildung 13 optisch dargestellt, zudem können hier die konkreten CRP-Werte der einzelnen Genotypen abgelesen werden. Das C-Allel des von uns untersuchten SNP ist demzufolge mit niedrigeren CRP-Serumspiegeln assoziiert

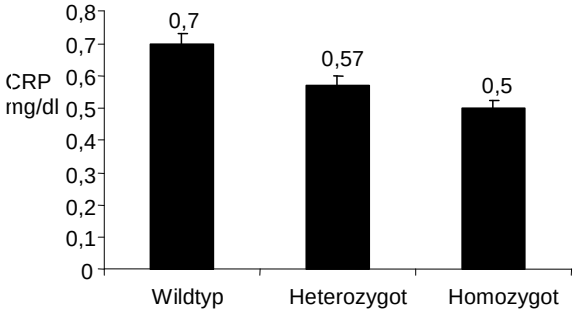

Abb. 13: Durchschnittliche CRP-Werte der Patienten mit CDAI < 150. Die Patienten sind ihrem CRP +1059 Genotyp entsprechend in drei Gruppen geteilt: 61 Patienten haben einen G/G-Wildtyp, neun sind G/C-heterozygot und 2 C/C-homozygot. „Wildtyp“ und „Homozygot“ unterscheiden sich signifikant voneinander (P < 0,001).

Für die Analyse der weiteren CDAI-Klassen standen zu wenige Patienten zur Verfügung. Einen CDAI zwischen 150 und 300 wies keiner der C/C-homozygoten Patienten auf, während kein G/C-Heterozygoter Patient einen CDAI > 300 hatte.

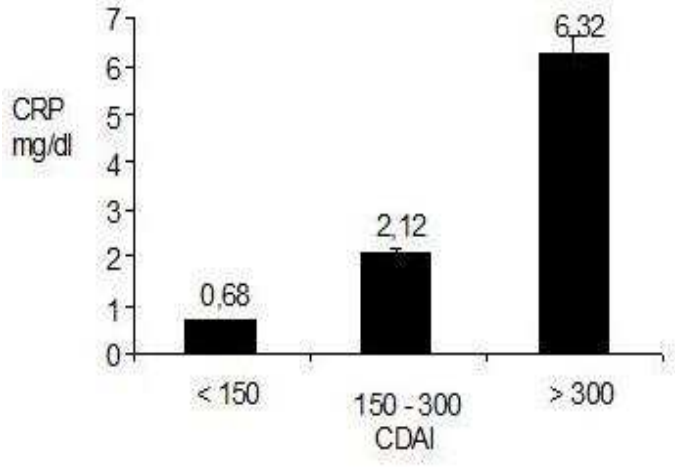

Abb. 14: **Die durchschnittlichen CRP-Werte der 133 M. Crohn-Patienten.** Zugeordnet einer der folgenden Gruppen: CDA I < 150 (73 Patienten), CDAI 150 – 300 (47 Patienten), CDAI >300 (13 Patienten).

Die 133 Patienten, anhand deren CDAI- und CRP-Werten der Zusammenhang zwischen den drei *CRP+1059*-Genotypen und den Serumspiegeln des C-Reaktiven Proteins analysiert wurde, sind wie oben bereits erwähnt, Teil der 241 Personen umfassenden gesamten Patientenpopulation. Tabelle 17 stellt die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen in dieser Subpopulation dar.

Genotypen des CRP +1059 SNP	133 MC-Patienten
G/G (Wildtyp)	116 (87,2%)
G/C (Heterozygot)	13 (9,8%)
C/C (Homozygot)	4 (3,0%)

Tab. 17: Absolute und relative Häufigkeit der drei *CRP +1059*-Genotypen der 133 Patienten, für die CRP-Werte und korrespondierende CDAI-Werte zur Verfügung standen.

4.5.3 Der Einfluss des Geschlechts auf den Zusammenhang zwischen CRP-Konzentration und *CRP +1059*-Genotyp

Eine Studie von Eklund (34) et al. aus dem Jahr 2005 zeigt, dass gesunde Männer mit mindestens einem *CRP +1059* SNP C-Allel signifikant niedrigere CRP-Werte aufwiesen als ihre Geschlechtsgenossen mit dem G/G-Wildtyp. Dieser relevante Unterschied konnte bei gesunden Frauen nicht festgestellt werden. Es ist also möglich, dass die bisher beschriebenen Unterschiede der CRP-Werte zwischen den Angehörigen der drei Genotypen in der Patientengruppe mit ruhender Erkrankung (CDAI < 150) vom Geschlecht der erkrankten Studienteilnehmer abhängt. Um dies zu untersuchen, haben wir zunächst die CRP-Werte der erkrankten Männer (Durchschnitt: 1,76 mg/dl) und Frauen (Durchschnitt: 1,72 mg/dl) gegenübergestellt. Hier wurden aber keine signifikanten Unterschiede gefunden (p = 0,93). Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass genau die Hälfte der 74 Frauen einen CDAI von 150 - 300 hatte, Gleiches aber nur für 39% (23 Männer) der 59 Männer galt (P = 0,044).

CDAI	**Männlich (n = 59)**	**Weiblich (n = 74)**	**Gesamt (n = 133)**	**P-Wert** (♂ vs.♀)
<150	36 (61,0%)	37 (50,0%)	73 (54,9%)	0,224
150 - 300	15 (25,4%)	32 (43,2%)	47 (35,3%)	0,044
> 300	8 (13,6%)	5 (6,8%)	13 (9,8%)	0,244

Tab. 18: CDAI-Werte der 133 Patienten. Verteilung auf die CDAI-Klassen < 150, 150 – 300, und größer 300. Zusätzlich wird hier der Anteil von Männern und Frauen in den drei Klassen angegeben.

In den zwei anderen CDAI-Gruppen ließen sich aber keine signifikanten Ungleichheiten in der Geschlechterverteilung feststellen, wie aus Tabelle 18 ersichtlich ist. Eine Aufgliederung der Serumspiegel des C-reaktiven Proteins in der Gruppe CDAI < 150 nach Geschlecht und *CRP +1059*-Genotyp zeigte bei männlichen Trägern des C-Allels signifikant niedrigere Werte als bei gleichgeschlechtlichen G/G-Wildtypen (p = 0,013 für G/G vs. C/G). Unter den 36 Männern mit Erkrankung in Remission war allerdings nur einer mit zwei C-Allelen zu finden, so dass eine statistische Aussage nicht möglich war.

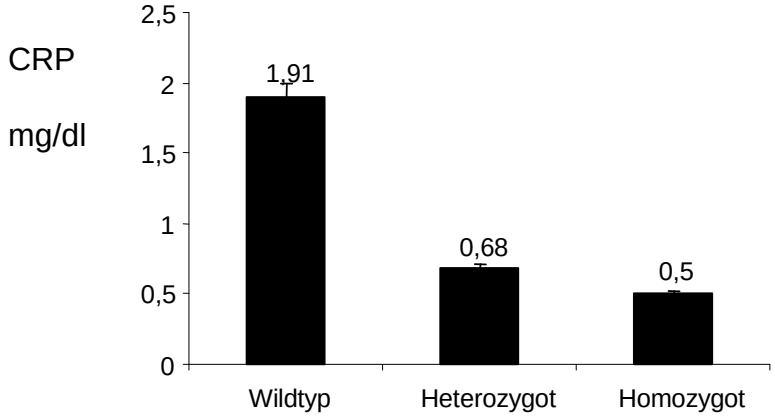

Abb. 15: **Durchschnittliche CRP-Werte der 59 Männer**. Das C-Allel des *CRP+1059* SNP führt zu signifikant niedrigeren Werten (P = 0,013 für G/Gvs. C/G). Nur ein Patient weist zwei C-Allele auf.

Bei den Frauen konnte ein gleichsinniger Zusammenhang nicht nachgewiesen werden. Die durchschnittlichen CRP-Werte waren 1,67 mg/dl bei den G/G-Wildtypen, 1,22 mg/dl bei den C/G-heterozygoten Frauen (p = 0,29 für G/G vs. C/G), die C/C-homozygoten wiesen einen Wert von 3,83 mg/dl auf.

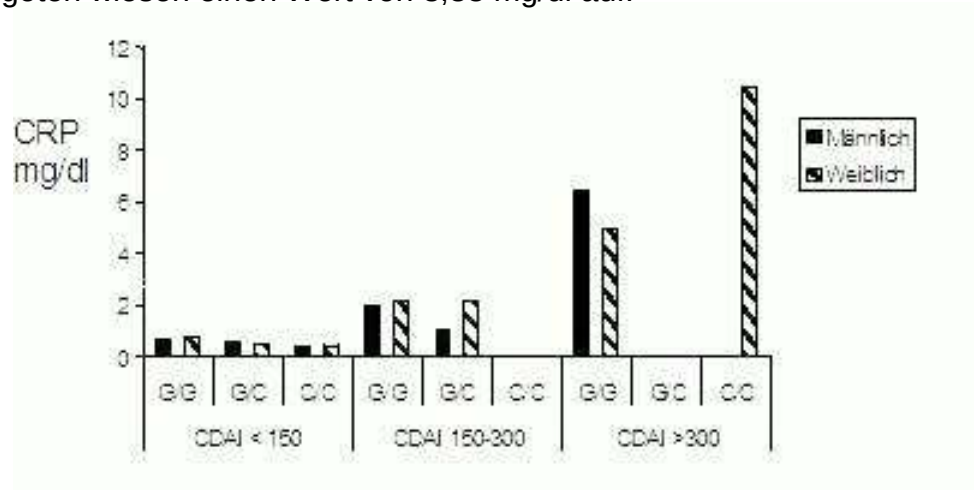

Abb. 16: Durchschnittliche CRP-Werte der 59 Männer und 74 Frauen nach CDAI und *CRP+1059* SNP aufgeschlüsselt. Fehlende Säulen: kein Patient in dieser Gruppe. Jeweils nur ein Patient in folgenden Gruppen: Männer, G/C CDAI <150 und 150 –300 und Frauen, Homozygot CDAI > 300.

4.6 Zusammenschau mit den drei *NOD2/CARD15*-Varianten

Der in den vorangehenden Kapiteln beschriebene Zusammenhang zwischen dem C-Allel des *CRP +1059* SNP und einer Krankheitsbeteiligung des terminalen Ileums bei Patienten, die an M. Crohn leiden, wurde in ähnlicher Weise auch für drei *NOD2/CARD15*-Varianten beschrieben(2, 44, 82, 93). Diese drei Varianten wurden in Kapitel 1.1.3 (Genetische Grundlagen des Morbus Crohn) näher beschrieben. Kürzlich wurde an einer Patienten-Kohorte, die ebenso aus der CED-Ambulanz des Universitätsklinikums Großhadern stammt, ein gehäuftes Vorkommen von intestinalen Stenosen bei homozygoten Trägern der *L1007fsinsC* (*3020insC*) *NOD2*-Mutation festgestellt. Diese Stenosen fanden sich besonders häufig im terminalen Ileum der Patienten. Daher wurde für jeden Patienten unserer Kohorte das Vorhandensein der drei mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-Varianten geprüft. Die kombinierte Prävalenz dieser drei *NOD2*-Varianten, namentlich *R702W, G908R* und *L1007fsinsC*, war 42,7%. Die getrennte Betrachtung der Häufigkeiten dieser Varianten in den entsprechenden drei *CRP +1059*-Genotypen ergab signifikante Werte nur für die R702W-Mutation. In der Gruppe der G/G-Wildtypen und der G/C-heterozygoten ergibt sich ein signifikanter Verteilungsunterschied der *R720W*-Mutation. Diese Mutation tragen 35,3% der heterozygoten Patienten, dagegen kommt sie nur bei 13,7% der Wildtyp Patienten vor (P = 0,029). Einen genaueren Überblick hierzu gibt Tabelle 19.

	G/G WT (n = 219)	**G/C HeZ (n = 17)**	**C/C HoZ (n =5)**
***R702W* (n= 40)**			
+/- (n =37)	30 (13,7%)	6 (35,3%) P = 0,029	1 (20%) P = 0,529
+/+ (n =3)	3 (1,4%)	---	---
***G908R* (n=18)**			
+/- (n =18)	15 (,8%)	3 (17,6%) P = 0,128	---
+/+ (n = 0)	---	---	---
***L100fsinsC* (n = 45)**			
+/- (n=32)	27 (12,3%)	3 (17,6%) P = 0,461	2 (40%) P = 0,126
+/+ (n = 13)	12 (5,5%)	1 (5,9%) P = 0,945	

Tab. 19: Häufigkeit der drei mit M. Crohn assoziierten NOD2-Varianten In den drei Genotypen des *CRP +1059* SNP. +/-: Mutation ist auf nur einem Allel vorhanden. +/+: Mutation befindet sich auf beiden Allelen. P-Werte in den Gruppen G/C und C/C sind jeweils gegen G/G gerechnet. Für relevante P-Werte D/C vs. C/C siehe Text. WT: Wildtyp, HeZ: Heterozygot, HoZ: Homozygot.

Auch wenn diese Mutation in den drei *CRP +1059*-Genotypen ungleich verteilt ist, ergibt sich hieraus kein Anhalt für eine eine Beteiligung des Ileums bei Patienten mit

M. Crohn. Zumindest aus der univariaten Analyse kann eine solche Assoziation nicht abgeleitet werden.

Wichtiger ist die Verteilung der *L1007fsinsC*-Mutation, schließlich wurde für sie bereits ein Zusammenhang mit einem Befall des Ileums nachgewiesen (93). Diese Variante kann in allen drei *CRP +1059*-Genotypen ungefähr gleich häufig beobachtet werden. Auf mindestens einem Allel tragen 17,8% der Patienten mit *CRP +1059*-Wildtyp, 23,5% der Heterozygoten und 40% der Homozygoten die *L1007fsinsC*-Mutation. Bedeutsame Verteilungsungleichheiten auf dem α = 5%-Niveau ergeben sich hierbei nicht (G/G vs. G/C: p = 0,522). Diese Beobachtungen setzen eine Unabhängigkeit der Assoziation zwischen dem *CRP +1059 SNP* und einer Beteiligung des Ileums bei an M. Crohn erkrankten Menschen von diesen drei *NOD2/CARD15*-Varianten voraus.

Auch wenn die Verteilung einzelner *NOD2*-Varianten auf die drei *CRP +1059*-Genotypen keine signifikanten Unterschiede erkennen lässt, ist die Verteilung der Summe aller *NOD2* Prävalenzen dennoch auffällig: Unter den heterozygoten G/C-Trägern (76,5%) haben deutlich mehr Patienten mindestens eine dieser Varianten als unter den G/G-Wildtypen (39,7% P = 0,0043). Zusätzlich ergibt die univariate Analyse eine Assoziation zwischen Krankheitslokalisation im Ileum und dem Vorhandensein irgendeiner der drei möglichen *NOD2*-Varianten, auch wenn dieser Zusammenhang schwächer ist als derjenige, den der *CRP +1059* SNP vermuten lässt (*NOD2*: P = 0,021 *CRP +1059* P = 0,008). Um eine mögliche Überlagerung dieser beiden Effekte aufzudecken haben wir eine Multivarianz-Analyse durchgeführt. Diese Analyse schloss den *CRP +1059* und *NOD2*-Genotyp eines jeden Patienten, deren Alter, die bisherige Krankheitsdauer und das Geschlecht ein und bekräftigte die Assoziation zwischen dem *CRP +1059*C-Allel und der Krankheitslokalisation im terminalen Ileum (L1) (G/C-heterozygote Patienten: p = 0,04; OR 3,72; 95%CI 1,06-13,06; C/C-homozygote Patienten: p = 0,04, OR 7,16 95% CI 1,06-48,52). Die multivariate Analyse zeigte die Unabhängigkeit zwischen Trägern mindestens eines C-Allels und einer Krankheitslokalisation im terminalen Ileum vom *NOD2*-Genotyp.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss des *CRP +1059*-Polymorphismus auf Krankheitssuszeptibiliät und Krankheitsphänotyp beim M. Crohn

5.1.1 *CRP +1059*-Polymorphismus und Krankheitssuszeptibilität

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die drei Genotypen des *CRP +1059* SNP Einfluss auf die Krankheitssuszeptibilität haben, ob diese die Ausprägung bestimmter Phänotypen des M. Crohn beeinflussen und Einfluss auf den CRP-Serumspiegel haben. Die Ergebnisse wurden im vorangehenden Kapitel vorgestellt und sollen nun auf den folgenden Seiten einer kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Auch wenn die Pathogenese des Morbus Crohn immer noch nicht komplett verstanden ist, wird dennoch weitgehend akzeptiert, dass diese Krankheit durch eine unkontrollierte Immunreaktion auf ein noch nicht näher beschriebenes luminales Antigen in einer genetisch prädisponierten Person zustande kommt. Dieses Antigen stammt wahrscheinlich aus der mikrobiellen Darmflora. Drei Varianten im *NOD2*-Gen, das für die *nucleotide binding and oligomerization domain (NOD) 2* kodiert, sind der bisher größte bekannte genetische Risikofaktor für die Entstehung eines M. Crohn (42, 50, 74). Diese Varianten können aber in bis zu 20% der Individuen einer normalen Population gefunden werden und sind angesichts der deutlich geringeren Prävalenz des M. Crohn nur für einen kleinen Teil des gesamten Risikos für die Entwicklung dieser CED verantwortlich.

In der letzten Zeit wurde ein Zusammenhang zwischen Varianten der Gene einiger Proteine, die in die Akute Phase Reaktion und der Erkennung von Bakterien eingebunden sind, und bestimmten phänotypischen Untergruppen des Morbus Crohn beschrieben. Unter anderem wurde eine Assoziation zwischen Krankheitsphänotyp und Genotyp für den Toll-like-Receptor 4 (TLR 4), (16) den CX3CR1, (9) und MIF (26) beschrieben. CRP gilt als das wichtigste Akute-Phase Protein, dennoch wurde der *CRP +1059*-Polymorphismus im C-Reaktiven Protein noch nicht auf einen ähnlichen Zusammenhang hin untersucht. Dieser SNP ist der bisher am besten charakterisierte Polymorphismus im CRP-Gen. Unter anderem wurde bei gesunden männlichen Blutspendern festgestellt, dass Träger des selteneren C-Allels eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für niedrigere basale CRP-Spiegel haben (34). Im Gegensatz zu den anderen

bisher veröffentlichten SNPs im CRP-Gen wurde dieser Polymorphismus noch nicht im Rahmen einer Assoziationsstudie auf seinen Zusammenhang mit dem M. Crohn untersucht (114).

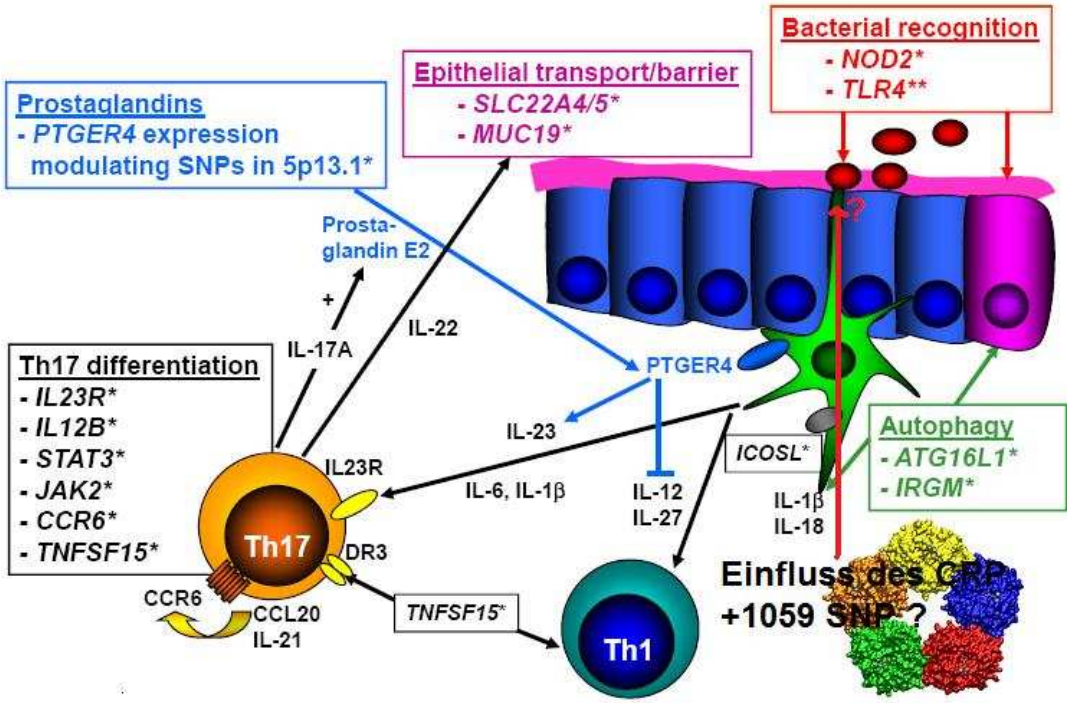

Abb 17: Die wichtigsten Gruppen der Suszeptibilitätsgene für den M. Crohn und Ihr Einfluss auf die Th-17 Differenzierung. Einfluss des CRP + 1059 SNP auf die Suszeptibiltät? Grafik verändert nach S. Brand (13).

Unsere Resultate zeigen, dass das C-Allel des *CRP +1059* SNP im Vergleich zur gesunden Normalpopulation nicht signifikant häufiger bei an M. Crohn Erkrankten Personen vorkommt. Auch wenn im Gegensatz zur Kontrollgruppe homozygote C/C-Träger nur in der Patientenkohorte aufgefallen sind, ergeben sich dennoch keine signifikanten Unterschiede (p = 0,066). Zumindest in dieser Population kann der *CRP +1059 SNP* nicht als Risikofaktor für die Entstehung eines M. Crohn gedeutet werden. Die Frage ob der homozygote C/C-Genotyp des *CRP +1059*-Polymorphismus die Krankheitssuszptibilität für den M. Crohn beeinflusst kann also noch nicht abschließend beantwortet werden. Da aber wie oben erwähnt andere Polymorphismen in Genen, die wie CRP an der Erkennung bakterieller Strukturen beteiligt sind (16) (9) (26), die Suszeptibilität für den M. Crohn beinflussen, darf ein Zusammenhang zwischen Krankheitssuszeptibilität und dem *CRP +1059*-Polymorphismus zumindest stark vermutet werden. Einschränkend muss aber bedacht werden, dass eine große Assoziationsstudie von Barrett (6) aus dem Jahr 2008 keinen der bekannten Poly-

morphismen im Gen des CRP mit dem M. Crohn verknüpft hat, das CRP bisher also nicht als Suszeptibilitätsgen für den M. Crohn gilt.

5.1.2 *CRP +1059*-Polymorphismus und Krankheitsphänotyp

Im Gegensatz zum fehlenden Einfluss auf die Krankheitssuszeptibilität des *CRP +1059*-Polymorphismus konnten wir eine Beziehung zwischen dem C-Allel des *CRP +1059* SNP und einer Krankheitsbeteiligung des Ileums bei an M. Crohn erkrankten Individuen zeigen. Das Ileum war bei nur 74% der G/G-Wildtypen befallen, aber bei allen C/C-homozygoten und fast allen C/G-heterozygoten Patienten beteiligt. Für die *1007fs*-Variante im Gen des *NOD2* wurde 2006 ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Phänotyp und Genotyp beschrieben (93). Der Effekt des von uns untersuchten CRP-Polymorphismus scheint aber davon unabhängig zu sein, denn in unserer Kohorte tragen Wildtypen (17,8%) und Heterozygote (23,5%) diese Variante nahezu gleich häufig. Da aber in der Gruppe der C-Allel-Träger die drei für den M. Crohn bedeutsamen *NOD2*-Varianten insgesamt häufiger waren als bei den Patienten, die zwei G-Allele tragen, konnte erst eine Multivarianz-Analyse diesen Zusammenhang zwischen einer überwiegend auf das terminale Ileum beschränkten Krankheitslokalisation – L1 nach der Vienna-Klassifikation – und dem C-Allel des *CRP +1059* SNP bestätigen. Dieser Effekt ist also unabhängig von der *1007fs*-Variante. Hingegen ist die Gruppe, die sich aus Patienten mit Krankheitslokalisation im terminalen Ileum und Ileocolon zusammensetzt, signifikant vom Vorhandensein mindestens einer *NOD2*-Variante beeinflusst. Dazu passt unsere Beobachtung, dass keiner der G/C-Heterozygoten einen isolierten Kolonbefall (L2) aufwies, diesen Phänotyp aber 21% der Patienten mit zwei G-Allelen hatten (P = 0,05).

Der bevorzugte Krankheitsbefall des Ileums bei Patienten mit mindestens einem C-Allel des *CRP +1059* SNP weist auf eine Assoziation dieses Polymorphismus mit einer fehlgesteuerten Immunantwort auf bakterielle Antigene im Intestinum hin. Die bakterielle Besiedlung vom terminalen Ileum zum Kolon verändert sich rapide. Die Konzentration der Bakterien steigt von 10^8 Bakterien pro Gramm im distalen Ileum auf 10^{11}-10^{12}/g im Kolon an; (90) dies ist ein mehr als tausendfacher Anstieg. Im Kolon herrscht dann die größte Bakteriendichte des gesamten Gastrointestinaltraktes.

Nirgendwo im gesamten Gastrointestinaltrakt kann ein auch nur annähernd großer Konzentrationsanstieg beobachtet werden wie vom terminalen Ileum zum Colon (Coecum). Das terminale Ileum ist also einer stärkeren bakteriellen Exposition ausgesetzt als der restliche Dünndarm. Die Ileozökalklappe stellt für Bakterien kein unüberwindbares Hindernis dar. Das C-reaktive Protein, der von uns untersuchte SNP liegt im zweiten Exon seines Gens, hat die Fähigkeit mit großer Affinität an Bakterien zu binden und eine Immunantwort zu induzieren (97). Auch das Protein NOD2, kodiert vom Gen *NOD2/CARD15*, erkennt bakterielle Bestandteile, insbesondere die Oberflächenstruktur Mureinsäure und ist somit an der Expression von Defensinen beteiligt. Vergleichbar mit der in dieser Arbeit beschriebenen Assoziation des *CRP +1059* SNP mit einer bevorzugten Ausbreitung des M. Crohn im Ileum ist auch die Variante *1007fs* des Gens *NOD2/CARD 15* ein starker Prädiktor für eine Mitbeteiligung des Ileum (93). Ferner zeigten Brand und Mitarbeiter im Jahr 2006 eine ähnliche Assoziation für den *T280M*-Polymorphismus im *CX3CR1*-Gen (14). Dieses Gen kodiert den Chemokin-Rezeptor CXCR1 an den das Chemokin Fractalkine bindet. Fractalkine kann durch Chemoattraktion Natürliche Killerzellen, CD8+-T-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen aktivieren (12). Im terminalen Ileum nehmen dendritische Zellen, die diesen Rezeptor exprimieren, eine wichtige Rolle bei der Phagozytose von Bakterien ein (73), wie Untersuchungen von Materialproben aus diesem Darmabschnitt zeigten.

Diese Befunde legen nahe, dass eine alternierende Erkennung intestinaler Bakterien und bakterieller Produkte durch das menschliche Abwehrsystem das Krankheitsgeschehen des M. Crohn in das terminale Ileum verschiebt. CRP, ATLG16, und der Fractalkinerezeptor (CX3CR1) sind alle am Erkennen und Prozessieren von bakteriellen Antigenen beteiligt. Einzelne Polymorphismen in diesen Genen oder auch bestimmte Haplotypen führen zu einer chronisch inflammatorischen Immunantwort. Besonders der 10^3-10^4–fache Anstieg der Bakteriendichte vom terminalen Ileum in das Kolon prädisponiert zu dieser pathologischen Reaktion.

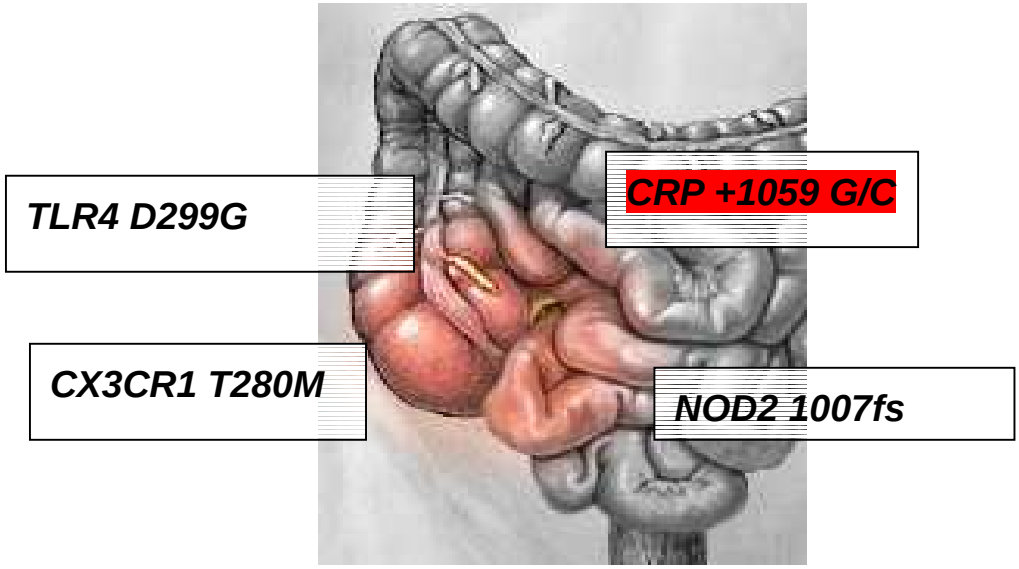

Abb. 18: Polymorphismen in Genen antibakterieller Proteine, die mit einem Befall des terminalen Ileums beim M. Crohn assoziiert sind (17) (15) (93).

Die bedeutende Rolle, die das C-reaktive Protein bei der Bakterienerkennung spielt, ist seit langem bekannt. So wurde es ursprünglich als Protein im Serum an Pneumonie erkrankter Menschen beschrieben, das mit dem C-Polysaccharid von Streptococcus pneumoniae präzipitiert (104). Genauer konnte der Mechanismus, der zur Erkennung bakterieller Oberflächenstrukturen durch das CRP und der dadurch ausgelösten Immunantwort führt, erst vor kurzem entschlüsselt werden (29, 69, 70, 101). So zeigt eine kürzlich veröffentlichte Studie einen durch CRP vermittelten Anstieg der Konzentration proinflammatorischer Zytokine durch eine Interaktion mit dem Fcγ-Rezeptor (70). Konsistent mit unserer Theorie kann man vermuten, dass das C-Allel des CRP-Gens zu einer höheren Konzentration dieser Zytokine führt. Noch fehlen leider funktionale Studien die klären, ob der durch den *CRP +1059*-SNP ausgelöste Phänotyp des M. Crohn tatsächlich durch eine fehlerhafte Erkennung bakterieller Strukturen ausgelöst wird. Aber auch verschiedene andere Polymorphismen in Genen von Proteinen - die wie das CRP am Erkennen oder Prozessieren bakterieller Bestandteile mitwirken - führen zu einem bevorzugtem Crohn-Befall des terminalen Ileums. Im Einzelnen sind die *1007fs*-Variante des *NOD2/CARD15*, der *T280M* Genotyp des Fractalkine-Rezeptors und der *Asp299Gly* SNP des Toll-Like-Rezeptors 4. Es liegt also insgesamt der Schluss nahe, dass diese Polymorphismen zu einer alternierenden Immunantwort führen. Diese veränderte Immunantwort verschiebt das Krankheitsgeschehen des M. Crohn zum terminalen Ileum, derjenigen Stelle, an der sich die Antigenexposition vom Ileum zum Kolon wie oben beschrieben rapide verändert.

5.2 Assoziation zwischen CRP-Serumspiegel und *CRP +1059*-Polymorphismus

In letzter Zeit wurde ein Versagen immunsuppressiver Therapien bei M. Crohn-Patienten mit niedrigen CRP-Spiegeln beschrieben. In dieser Studie zeigen wir den Effekt des *CRP +1059* SNP auf den CRP-Serumsspiegel. Unsere Daten belegen eine Assoziation des selteneren C-Allels mit niedrigeren CRP-Werten. Besonders deutlich ist dieser Zusammenhang bei männlichen Patienten mit ruhender Erkrankung, also einem CDAI <150. Das Männer mit dem C-Allel durchschnittlich niedrigere Serumspiegel haben als Frauen mit dem gleichen Allel ist eine bekannte Tatsache. Einige Autoren sehen als Ursache dieses geschlechtsabhängigen Effekts eine den CRP-Spiegel modulierende Wirkung des Östradiols bei Frauen an (102). Beweise für diese Annahme stehen jedoch noch aus. Ein signifikant höherer Anteil von Frauen in der Gruppe mit CDAI 150-300 (♂:25,4% ♀:43,2% P = 0,044) mag auch Einfluss auf dieses Ergebnis genommen haben. Die Wirkung des Polymorphismus bei Patienten mit aktiver Erkrankung kann durch eine unzureichende Repräsentation der entzündlichen Aktivität durch den CDAI verschleiert werden. Eine ähnliche vom Geschlecht abhängige Wirkung auf die Serumkonzentrationen des CRP wurde auch bei gesunden Blutspendern festgestellt. Männliche Probanden mit einem C-Allel wiesen niedrigere Spiegel auf (34). Mögliche Begründung für die hier beschriebenen Effekte kann eine Änderung der Aminosäuresequenz des CRP sein. Der Basentausch in diesem Polymorphismus führt aber nicht zum Wechsel einer Aminosäure im CRP, in beiden Fällen wird Leucin transkribiert, der SNP ist also eine „stille“ Mutation. Potentielle Effekte könnten möglicherweise auf der Ebene der m-RNA vermittelt werden. Andere Erklärungsmodelle, die die Auswirkung dieses SNP funktionell beschreiben, liegen derzeit noch nicht vor.

5.3 Kritische Betrachtung der Studienpopulation

Die Frequenz von *CRP +1059*-C/C-homozygoten Personen in der Normalbevölkerung ist sehr gering, diese Tatsache erschwert den Ausschluss eines statistischen Fehlers zweiter Art in unserer Studie. Im National Center of Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) sind die *CRP +1059* Genotypen von 1016 In-

dividuen hinterlegt. In dieser größten diesbezüglich untersuchten Population wurde lediglich ein C/C-Träger, entsprechend 0,1%, nachgewiesen. 8,4% waren G/C-heterozygot und 91,5% trugen den Wildtyp. Dies entspricht dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zufolge einer Frequenz des C-Allels von 3,1%. Die Erstbeschreiber des *CRP+1059* Polymorphismus, Cao und Hegele, fanden eine Frequenz von 10,9% (19). In unserer Patientenkohorte weisen 14,7% dieses seltenere Allel auf. Im gesamten Studienkollektiv aus Patienten- und Kontrollgruppe nähert sich mit 10,4% die von uns gefundene Häufigkeit derjenigen, die von Cao und Hegele (19) beschrieben wurde. (http://www.changbioscience.com/genetics/hardy.html).

Um die Problematik, der wir bei der Auswertung der Daten gegenüberstanden, näher zu erläutern, sei hier ein fiktives Rechenbeispiel mit folgenden zwei Grundannahmen vorgestellt: es wird angenommen, dass die Verteilung der Genotypen in unserer Kontrollgruppe derjenigen gleicht, die im NCBI beschrieben wurde. Nehmen wir weiterhin an, in der Patientengruppe ist der C/C-Genotyp doppelt so häufig (0,2%) und der Fehler, fälschlicherweise zu behaupten, diese Häufigkeit repräsentiere die gesamte Patientenpopulation, soll kleiner 5% (Fehler erster Art, $\alpha < 0,05$) sein. Um diesen Test mit einer Trennschärfe oder Power von 80% ($1 – \beta$ [Fehler zweiter Art]) durchführen zu können, müsste die Kontrollgruppe 25.000 gesunde Personen fassen. In der in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppe waren immerhin 2,1% C/C-Träger. Um mit der gleichen Trennschärfe von 80% einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe festzustellen, müsste die Kontrollgruppe immer noch mindestens 1042 Individuen beinhalten.

Aus dem hier dargestellten wird die Schwierigkeit ersichtlich, den Einfluss von zwei C-Allelen auf den M. Crohn-Phänotyp oder den CRP-Wert in einer einzelnen Studie mit den M. Crohn-Patienten einer einzelnen Klinik durchzuführen. Würde man zum Beispiel unserer Patientengruppe (fünfmal C/C in 241) die NCBI-Population (einmal C/C in 1016) als Kontrollgruppe gegenüber stellen, ergibt sich hier ein signifikanter Unterschied an C/C-Trägern ($P = 0,0013$). Letztendlich ist eine deutlich größere Kohorte notwendig um um unsere Theorie einer Beeinflussung der Krankheitssuszeptibilität durch den *CRP +1059* SNP statistisch signifikant untermauern oder wiederlegen zu können. Vor allem da das Gen des C-reaktiven Proteins in bisherigen genomweiten Assoziationsstudien nicht als M. Crohn-Gen bechrieben wurde.

5.4 CRP-Serumspiegel und das Ansprechen auf immunsuppressive Therapien

Auch andere Polymorphismen im Gen des CRP und ihre Auswirkungen auf den CRP-Spiegel waren in letzter Zeit im Fokus des wissenschaftlichen Interesses. Für drei Polymorphismen *(-717G/A, 1444C/T und CRP 4A*) wurden bei Patienten mit aktivem M. Crohn kein signifikant differierender CRP-Spiegel oder Unterschiede im klinischen und biologischen Ansprechen auf eine Therapie mit Infliximab festgestellt (114). Andere Ergebnisse lieferte eine Studie mit Patienten, die an KHK oder SLE litten: der CRP 1444C/T SNP war mit höheren, der CRP 4A Polymorphismus mit niedrigeren CRP-Konzentrationen assoziiert (18, 85). In einer weiteren Arbeit mit KHK-Patienten und einer Kontrollgruppe konnte dieser Zusammenhang aber nicht bestätigt werden (59). Von großer Bedeutung ist hier die von Louis et al 2002 beschriebene Abhängigkeit des Ansprechens auf eine Therapie mit Infliximab vom CRP-Serumspiegel. Patienten mit höhreren Spiegeln sprachen auf die Behandlung besser an (64). Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Studien, die mögliche Einflüsse auf die Wirksamkeit von Certolizumab Pegol (ein glykosiliertes Polyethylen-Fab-Fragment des TNF-α-Antikörper, CDP870) (92) und den gegen Tumor-Nekrose-Faktor-α gerichteten Wirkstoff CDP571 (35) untersuchten. Es ist daher wünschenswert, in Zukunft detailreichere Kenntnis über die Auswirkungen von Polymorphismen im Gen des CRP zu erlangen, um gegen den TNF-α gerichtete Therapiestrategien besser steuern zu können. Vielleicht kann es dann gelingen bestimmte Haplotypen des CRP zu bestimmen, um dann Patienten zu selektionieren, die von einer Behandlung mit TNF-α-Antikörpern besonders profitieren. 88 der von uns untersuchten 241 Patienten wurden mindestens einmal mit Infliximab therapiert. Nur sechs dieser Patienten trugen mindestens ein C-Allel des CRP+1059 Polymorphismus, sein Einfluss auf das Ansprechen auf diese Behandlung konnte somit nicht sinnvoll analysiert werden.

Warum kommen die oben beschriebenen Studien über die Auswirkungen der verschiedenen CRP-Polymorphismen zu teilweise gegensätzlichen Ergebnissen? (18, 85, 114) Einerseits sind die Effekte dieser Polymorphismen auf die grundlegenden CRP-Spiegel gesunder Personen so gering, dass sie statistisch erst in sehr großen Kohorten deutlich werden, (59) anderseits ist die entzündliche Aktivität in Patienten mit z.B. einem aktiven M. Crohn schwer kategorial fassbar, somit sind die in diesen

Fällen deutlich erhöhten Serumkonzentrationen nicht gut vergleichbar. Die durch Entzündung erhöhten CRP-Spiegel wirken hier also als Störfaktoren. Zudem ist die individuelle Entzündungsreaktion von vielen anderen Faktoren beeinflusst, die dann ebenso als Störfaktoren wirken. Wie Zwillingsstudien nahe legen, sind 30-40% dieser Faktoren vererbt, (78) ein nicht nachvollziehbares Ausbleiben eines CRP-Anstiegs kann also genetisch determiniert sein (114). Nichtsdestotrotz korreliert ein Anstieg des CRP bei an M. Crohn erkrankten Individuen mit der klinischen Krankheitsaktivität, endoskopisch und histologisch sichtbarer Inflammation und einigen anderen Entzündungsparametern (99). Dies haben wir an unserer Patientenkohorte demonstriert, indem wir die durchschnittlichen CRP-Werte von drei Gruppen mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität, gemessen anhand des CDAI, verglichen haben – mit zunehmender Aktivität stiegen die durchschnittlichen Werte an. Zudem ergaben unsere Ergebnisse niedrigere CRP-Werte für Patienten, die an der Stelle des *CRP +1059*-Polymorphismus hetero- und homozygot waren. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist ein 2006 veröffentlichtes Manuskript, das niedrige CRP-Spiegel bei aktiver Erkrankung mit vorherrschender Krankheitsausbreitung im Ileum assoziiert (36). 22 der 223 Patienten dieser Studie erfüllten das Kriterium „niedriges CRP“. Bei fast allen (95%) dieser 22 war das Ileum beteiligt, während dies nur für die Hälfte (53%) der übrigen Patienten zutraf ($p < 0{,}01$) (36). Bezieht man die Ergebnisse unserer Arbeit in die Interpretation dieser Studie ein, ist es durchaus möglich, dass die Assoziation von niedrigem CRP und Krankheitslokalisation durch einen hetero- oder homozygoten *CRP +1059*-Genotyp mitbeeinflusst ist. Denn wir konnten in unserer Arbeit für diese Genotypen sowohl eine bevorzuge Krankheitslokalisation im Ileum als auch niedrigere CRP-Werte, verglichen mit dem Wildtyp, zeigen.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass die Assoziation des *CRP +1059* SNP mit einem Befall des Ileum bei Morbus Crohn unabhängig von den drei bedeutsamen *NOD2/CARD15*-Varianten ist. Weiterhin wurden Homozygote C/C-Träger nur in der Gruppe der M. Crohn-Patienten gefunden, dieser Unterschied ist aber nicht signifikant. Eine Beeinflussung der Krankheitssuzeptibilität für den M.Crohn kann vermutet werden und bedarf eines Beweises durch größere Studien. Ein Vergleich der durchschnittlichen CRP-Werte zeigt, dass sich Träger des C-Allels durch niedrigere CRP-Spiegel auszeichnen. Für diese Untersuchung wurden die Patienten nach dem CDAI in Gruppen eingeteilt um die Krankheitsaktivität in die Analyse miteinbeziehen zu können. Da die Frequenz des C-Allels in der Gesamtbevölkerung niedrig ist und so-

mit C/C-homozygote sehr selten gefunden werden bedarf es wie oben angedeutet sehr großer Studien, um eine mögliche Assoziation dieses Allels mit M. Crohn aufzudecken und seinen Einfluss auf gegen den TNF gerichtete Therapien definieren zu können.

6 Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung:

Anti-TNF-α-Antikörper sind ein wichtiges therapeutisches Prinzip bei der Behandlung des M. Crohn. Die Höhe des CRP-Spiegels im Serum beeinflusst die Wirksamkeit von Therapeutika, die sich gegen das proinflammatorische Zytokin TNF-α richten. Der *CRP +1059*-Polymorphismus wurde noch nicht hinsichtlich seines Einflusses auf die Krankheitssuszeptibilität beim M. Crohn geprüft. Ziel dieser Arbeit war es (1.) die Auswirkungen des *CRP +1059*-Polymorphismus auf die Krankheitssuszeptibilität beim M. Crohn zu prüfen und (2.) zu untersuchen, ob dieser Polymorphismus den Krankheitsphänotyp der M. Crohn-Patienten beeinflusst. Schließlich sollte (3.) unter Berücksichtigung der drei Genotypen des *CRP +1059*-Polymorphismus die Höhe der CRP-Spiegel von M. Crohn-Patienten analysiert werden. In diese Betrachtungen wurde auch der *CARD15/NOD2*-Genotyp der Patienten mit einbezogen. Außerdem wurde die Verteilung der Genotypen dieses Polymorphismus in Patienten- und Kontrollgruppe untersucht.

Methoden:

Mit der Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse haben wir die genomische DNA von 241 an M. Crohn erkrankten Patienten und 199 Kontrollprobanden untersucht und den Genotyp des *CRP +1059* Polymorphismus bestimmt. Anschließend wurde das Ergebnis bezüglich der wichtigsten mit M. Crohn assoziierten *NOD2/CARD15*-Mutationen analysiert. Als Restriktionsendonuklease verwendeten wir das Enzym Mae III. Im Serum dieser Patienten wurde die Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) bestimmt. Zuvor wurden die Patienten gebeten, ein CDAI-Tagebuch (Crohn´s Disease Activity Index) zu führen, um die CRP-Spiegel mit diesen CDAI-Werten korrelieren zu können.

Ergebnisse:

Homozygote C/C-Träger des *CRP +1059*-Polymorphismus wurden nur unter den M. Crohn-Patienten gefunden ($p = 0,066$). Patienten mit Befall des terminalen Ileum wurden in lediglich 58,4% der Patienten mit einem G/G-Wildtyp gefunden, während 88,2% der G/C-Heterozygoten und vier der fünf C/C-Homozygoten (80%) diesen Phänotyp aufwiesen. Diese Assoziation war unabhängig von den drei *NOD2/CARD15*-Varianten. Eine erhöhte Krankheitsaktivität ging mit höheren CRP-

Spiegeln einher. In der Gruppe der Patienten mit einem Crohn´s disease activity index <150 wiesen die C/C-Homozygoten signifikant niedrigere CRP-Spiegel auf (P<0,01).

Schlussfolgerung:

Das C-Allel des *CRP +1059* SNP ist mit erniedrigten CRP-Werten assoziiert und erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Erkrankungsbefalls des terminalen Ileums bei M. Crohn-Patienten. Homozygote Träger dieses Allels haben wir nur bei M. Crohn-Patienten gefunden. Ein Zusammenhang zwischen diesem Genotyp und der Erkrankung darf aufgrund der Seltenheit homozygoter C-Allel-Merkmalsträger nur vermutet werden und muss in Studien mit wesentlich größerer Patientenzahl bewiesen werden. Der mögliche Einfluss des *CRP +1059*-Polymorphismus auf die Krankheitssuszeptibilität beim M. Crohn konnte also nicht bestätigt werden. In den letzten Jahren haben andere Studien bereits gezeigt, dass niedrigere CRP-Spiegel zu einem bevorzugten Befall des terminalen Ileums bei Patienten mit Morbus Crohn führen. In der vorliegenden Arbeit zeigten wir eine Assoziation zwischen dem C-Allel des *CRP +1059*-Polymorphismus und erniedrigtem CRP-Spiegel, sowie einem Crohn-Befall des Ileums. Insgesamt unterstützt diese Arbeit die Hypothese, dass bestimmte Polymorphismen in Genen von Proteinen, die bakterielle Strukturen erkennen können, zu einem bevorzugtem Befall des Ileums führen. Dies scheint durch eine veränderte Immunantwort bedingt zu sein. Gleichartige Befunde wie für den *CRP +1059* Polymorphismus wurden auch für andere Gene beschrieben, die für das Erkennen bakterieller Bestandteile essenziell sind. Unter anderen sind hier bestimmte Polymorphismen im Gen *NOD2/CARD15,* im Gen des Toll-Like-Rezeptors 4 (*TLR4*), und des Fractalkine-Rezeptors (*CX3CR1*) besonders wichtig. Da kürzlich gezeigt wurde, dass der CRP-Serumspiegel das Ansprechen auf den TNF-α-Antikörper Infliximab beeinflusst, kann es in Zukunft gelingen, bestimmte Haplotypen des CRP zu definieren, die ein besonders gutes Ansprechen auf eine solche Therapie voraussagen.

7 Tabellen und Abbildungsverzeichnis

7.1 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziierte genetische Risikomarker	S.15
Tab. 2	Die 30 in der Metaanalyse von Barrett et al beschriebenen Suszeptibilitätsloci die mit M. Crohn assoziiert sind	S. 19
Tab. 3	Vienna-Klassifikation des M. Crohn nach Gasche et al	S. 21
Tab. 4	Die acht Parameter die in die Berechnung des CDAI eingehen	S. 22
Tab. 5	Single Nucleotide Polymorphismen im Gen des CRP die Einfluss auf den CRP-Spiegel haben	S. 25
Tab. 6	Arbeitsschritte zur Isolierung von DNA aus Vollblut	S. 28
Tab. 7	Verwendete Primer	S. 29
Tab. 8	PCR-Ansatz und PCR-Reaktion	S. 30
Tab. 9	Schnittstelle des Enzyms Mae III	S. 32
Tab. 10	Ansatz zum Verdau des PCR-Produkts mit Mae III	S. 32
Tab. 11	Verwendete Chemikalien und Substanzen	S. 36
Tab. 12	Verwendete Geräte	S.36
Tab. 13	Demographische Merkmale der Studienpopulation	S. 38
Tab. 14	Zusammenhänge zwischen den Genotypen des *CRP +1059* SNP und den Krankheitseigenschaften der 241 M. Crohn Patienten	S. 40
Tab. 15	erteilung der 241 Patienten auf die 24 Untergruppen der Vienna-Klassifikation	S.41
Tab. 16	Verteilung der drei möglichen Genotypen des *CRP +1059* SNP auf Fall und Kontrollgruppe	S. 41
Tab. 17	Absolute und relative Häufigkeit der drei *CRP +1059*-Genotypen der 133 Patienten, für die CRP-Werte und korrespondierende CDAI-Werte zur Verfügung standen	S. 46

Tab. 18 CDAI-Werte der 133 Patienten.Verteilung auf die CDAI-Klassen < 150, 150 – 300, und größer 300 S.46

Tab. 19 Häufigkeit der drei mit M. Crohn assoziierten *NOD2*-Varianten In den drei Genotypen des *CRP +1059* SNP S. 48

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die Dysbalance von pro-und antiinflammatorischen Zytokinen beim M. Crohn S. 12

Abb. 2 Entwicklung von Th1, Th2, Th17 und Treg-Zellen aus naiven CD4+-Zellen S.13

Abb. 3 Zehntausendfacher Anstieg der Bakterienkonzentration vom terminalen Ileum zum Zäkum/proximalen Kolon S. 15

Abb. 4 Schema des Gens *NOD2*. Die von Cuthbert untersuchten Polymorphismen und Ihre Lokalisation im Protein *NOD2/CARD15* S. 18

Abb. 5 Liganden des CRP S. 23

Abb. 6 Im Blut zirkuliert das C-reaktive Protein als Pentamer S. 24

Abb. 7 Kontrolle der PCR-Produkte S. 31

Abb. 8 Die drei möglichen Genotypen des *CRP +1059* SNP S. 33

Abb. 9 Alter bei Erstdiagnose im Patientenklientel. Dargestellt als Kaplan-Maier Analyse S. 39

Abb. 10 Die Verteilung der 241 Crohn-Patienten auf die Parameter der Vienna-Klassifikation S. 39

Abb. 11 Relatives Risiko, dem ein Patient mit *CRP +1059* G/G-Wildtyp , G/C-heterozygotem oder C/C-homozygotem Genotyp unterliegt, eine bestimmte Krankheitslokalisation L1 bis L4 nach der Vienna-Klassifikation zu entwickeln S. 43

Abb. 12 Streuung der CRP-Werte in den einzelnen CDAI-Klassen S. 44

Abb. 13	Durchschnittliche CRP-Werte der Patienten mit CDAI < 150	S. 45
Abb. 14	Die durchschnittlichen CRP-Werte der 133 M. Crohn-Patienten	S. 45
Abb. 15	Durchschnittliche CRP-Werte der 59 Männer	S. 47
Abb. 16	Durchschnittliche CRP-Werte der 59 Männer und 74 Frauen nach CDAI und CRP+1059 SNP aufgeschlüsselt	S. 47
Abb. 17	Die wichtigsten Gruppen der Suszeptibilitätsgene für den M. Crohn und Ihr Einfluss auf die Th-17 Differenzierung	S. 51
Abb. 18	Polymorphismen in Genen antibakterieller Proteine, die mit einem Befall des terminalen Ileums beim M. Crohn assoziiert sind	S. 54

8 Literaturverzeichnis

1. Abernathy TJ AO. The occurrence during infections of a protein not normally presented in blood: I. Distribution of the reactive protein in patient´s sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C-polysaccharide of pneumococcus. J Exp Med 73: 173-82, 1941.
2. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. Gastroenterology 123 (3): 679-88, 2002.
3. Agrawal A, Volanakis JE. Probing the C1q-binding site on human C-reactive protein by site-directed mutagenesis. J Immunol 152 (11): 5404-10, 1994.
4. Barnich N, Carvalho FA, Glasser AL, Darcha C, Jantscheff P, Allez M, Peeters H, Bommelaer G, Desreumaux P, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. J Clin Invest 117 (6): 1566-74, 2007.
5. Barnich N, Darfeuille-Michaud A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 13 (42): 5571-6, 2007.
6. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhart AH, Targan SR, Xavier RJ, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghori J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. Nat Genet 40 (8): 955-62, 2008.
7. Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F, Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. Gastroenterology 70 (3): 439-44, 1976.
8. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fcgamma receptor II. J Exp Med 190 (4): 585-90, 1999.
9. Binion DG, Kugathasan S, Dwinell MB. Molecular stratification of Crohn's disease by chemokine receptors: fractalkine receptor polymorphisms define a fibrostenosing ileal subgroup. Am J Gastroenterol 101 (1): 107-9, 2006.
10. Braat H, Peppelenbosch MP, Hommes DW. Immunology of Crohn's disease. Ann N Y Acad Sci 1072: 135-54, 2006.
11. Braat H, Stokkers P, Hommes T, Cohn D, Vogels E, Pronk I, Spek A, van Kampen A, van Deventer S, Peppelenbosch M, Hommes D. Consequence of functional Nod2 and Tlr4 mutations on gene transcription in Crohn's disease patients. J Mol Med 83 (8): 601-9, 2005.
12. Brand S. Chronsich entzündliche Darmerkrankungen. In: Göke B, ed. Gastroenterologie systematisch. Vol. 2. Bremen: UNI-MED, 2007.

13. Brand S. Crohn´s disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn´ s disease. Gut, in press, 2009.
14. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, al e. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn´s diesease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease phenotype. Am J Gastroenterol 101: 99-106, 2006.
15. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Goke B, Ochsenkuhn T, Lohse P. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. Am J Gastroenterol 101 (1): 99-106, 2006.
16. Brand S, Staudinger T. 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 11 (7): 645-52, 2005.
17. Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Goke B, Lohse P, Ochsenkuhn T. 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 11 (7): 645-52, 2005.
18. Brull DJ, Serrano N, Zito F, Jones L, Montgomery HE, Rumley A, Sharma P, Lowe GD, World MJ, Humphries SE, Hingorani AD. Human CRP gene polymorphism influences CRP levels: implications for the prediction and pathogenesis of coronary heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 23 (11): 2063-9, 2003.
19. Cao H, Hegele RA. Human C-reactive protein (CRP) 1059G/C polymorphism. J Hum Genet 45 (2): 100-1, 2000.
20. Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR. 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 95 (13): 7502-7, 1998.
21. Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, Fields CT, Rabenau K, Corradino S, Brant SR, Espinosa R, LeBeau M, Hanauer SB, Bodzin J, Bonen DK. Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. Hum Mol Genet 9 (9): 1425-32, 2000.
22. Crawford DC, Sanders CL, Qin X, Smith JD, Shephard C, Wong M, Witrak L, Rieder MJ, Nickerson DA. Genetic variation is associated with C-reactive protein levels in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. Circulation 114 (23): 2458-65, 2006.
23. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. 1932. Mt Sinai J Med 67 (3): 263-8, 2000.
24. Cummings JR, Ahmad T, Geremia A, Beckly J, Cooney R, Hancock L, Pathan S, Guo C, Cardon LR, Jewell DP. Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. Inflamm Bowel Dis 13 (9): 1063-8, 2007.
25. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew

CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 122 (4): 867-74, 2002.

26. Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, Sisic Z, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Konrad A, Tillack C, Otte JM, Diebold J, Goke B, Ochsenkuhn T, Lohse P, Brand S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 13 (1): 71-82, 2007.
27. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P, Gallimore JR, Pepys MB. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. Bmj 321 (7255): 199-204, 2000.
28. Dassopoulos T. Diagnostic methodologies: serology, endoscopy, and radiology. Curr Gastroenterol Rep 3 (6): 491-9, 2001.
29. Du Clos TW, Mold C. C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. Immunol Res 30 (3): 261-77, 2004.
30. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, Brown JL, Ehrlich GD, Weeks DE, Aston CE. Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. Am J Hum Genet 63 (1): 95-100, 1998.
31. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfutzer R, Weeks DE. High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. Am J Hum Genet 66 (6): 1857-62, 2000.
32. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. Clin Infect Dis 44 (2): 256-62, 2007.
33. Ekbom A. The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed? Inflamm Bowel Dis 10 Suppl 1: S32-4, 2004.
34. Eklund C, Lehtimaki T, Hurme M. Epistatic effect of C-reactive protein (CRP) single nucleotide polymorphism (SNP) +1059 and interleukin-1B SNP +3954 on CRP concentration in healthy male blood donors. Int J Immunogenet 32 (4): 229-32, 2005.
35. Feagan BG, Sandborn WJ, Baker JP, Cominelli F, Sutherland LR, Elson CO, Salzberg BA, Archambault A, Bernstein CN, Lichtenstein GR, Heath PK, Cameron S, Hanauer SB. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of CDP571, a humanized monoclonal antibody to tumour necrosis factor-alpha, in patients with corticosteroid-dependent Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 21 (4): 373-84, 2005.
36. Florin TH, Paterson EW, Fowler EV, Radford-Smith GL. Clinically active Crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. Scand J Gastroenterol 41 (3): 306-11, 2006.
37. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. Br J Nutr 93 Suppl 1: S41-8, 2005.
38. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. Inflamm Bowel Dis 6 (1): 8-15, 2000.
39. Gibson PR, Weston AR, Shann A, Florin TH, Lawrance IC, Macrae FA, Radford-Smith G. Relationship between disease severity, quality of life and health-

care resource use in a cross-section of Australian patients with Crohn's disease. J Gastroenterol Hepatol 22 (8): 1306-12, 2007.

40. Godet PG, May GR, Sutherland LR. Meta-analysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. Gut 37 (5): 668-73, 1995.
41. Hage FG, Szalai AJ. C-reactive protein gene polymorphisms, C-reactive protein blood levels, and cardiovascular disease risk. J Am Coll Cardiol 50 (12): 1115-22, 2007.
42. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. Lancet 357 (9272): 1925-8, 2001.
43. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. Nat Genet 39 (2): 207-11, 2007.
44. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. Lancet 359 (9318): 1661-5, 2002.
45. Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. Am J Hum Genet 65 (6): 1647-55, 1999.
46. Harvey RF, Bradshaw JM. A simple index of Crohn's-disease activity. Lancet 1 (8167): 514, 1980.
47. Heller F, Fuss IJ, Nieuwenhuis EE, Blumberg RS, Strober W. Oxazolone colitis, a Th2 colitis model resembling ulcerative colitis, is mediated by IL-13-producing NK-T cells. Immunity 17 (5): 629-38, 2002.
48. Henckaerts L, Figueroa C, Vermeire S, Sans M. The role of genetics in inflammatory bowel disease. Curr Drug Targets 9 (5): 361-8, 2008.
49. Herold M. Labordiagnostik gezielt einsetzen. Ärzte Woche Online 3. Jahrgang (2), 2004.
50. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature 411 (6837): 599-603, 2001.
51. Hundorfean G, Zimmer KP, Strobel S, Gebert A, Ludwig D, Buning J. Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules: in vivo study in Crohn's ileitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 293 (4): G798-808, 2007.
52. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. J Biol Chem 276 (4): 2551-4, 2001.

53. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, Archambault A, Fedorak RN, Groll A, Kinnear D, Saibil F, McDonald JW. Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. Canadian Crohn's Relapse Prevention Trial Study Group. Gastroenterology 106 (2): 287-96, 1994.

54. Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE, Powell JT. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. Circulation 103 (18): 2260-5, 2001.

55. Jörg C., Hoffmann AJK, Klump B. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen. Stuttgart: Thieme, 2004.

56. Kleessen B, Kroesen AJ, Buhr HJ, Blaut M. Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls. Scand J Gastroenterol 37 (9): 1034-41, 2002.

57. Kobayashi R, Okamura S, Ohno T, Saito H, Mori M, Ra C, Okayama Y. Hyperexpression of FcgammaRI and Toll-like receptor 4 in the intestinal mast cells of Crohn's disease patients. Clin Immunol 125 (2): 149-58, 2007.

58. Kopp E, Medzhitov R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. Curr Opin Immunol 15 (4): 396-401, 2003.

59. Kovacs A, Green F, Hansson LO, Lundman P, Samnegard A, Boquist S, Ericsson CG, Watkins H, Hamsten A, Tornvall P. A novel common single nucleotide polymorphism in the promoter region of the C-reactive protein gene associated with the plasma concentration of C-reactive protein. Atherosclerosis 178 (1): 193-8, 2005.

60. Kuster W, Purrmann J, Funk S, Strohmeyer G. [Genetics of Crohn disease. A family study of 265 patients with Crohn disease]. Med Klin (Munich) 82 (20): 679-82, 721, 1987.

61. Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HW, Verheugt FW, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor: more than an epiphenomenon? Circulation 100 (1): 96-102, 1999.

62. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. Gastroenterology 125 (1): 47-57, 2003.

63. Lockhart-Mummery HE, Morson BC. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. Gut 1: 87-105, 1960.

64. Louis E, Vermeire S, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Reynaert H, D'Haens G, Malaise M, Belaiche J. A positive response to infliximab in Crohn disease: association with a higher systemic inflammation before treatment but not with -308 TNF gene polymorphism. Scand J Gastroenterol 37 (7): 818-24, 2002.

65. MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, Pepys MB. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. Clin Chem 50 (1): 130-4, 2004.

66. MacLean CH, Mojica WA, Newberry SJ, Pencharz J, Garland RH, Tu W, Hilton LG, Gralnek IM, Rhodes S, Khanna P, Morton SC. Systematic review of the effects of n-3 fatty acids in inflammatory bowel disease. Am J Clin Nutr 82 (3): 611-9, 2005.

67. Mahid. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Mayo Clin Proc. 81 (11): 1462-71, 2006.

68. Maloy KJ. The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. J Intern Med 263 (6): 584-90, 2008.
69. Marnell L, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. Clin Immunol 117 (2): 104-11, 2005.
70. Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein increases cytokine responses to Streptococcus pneumoniae through interactions with Fc gamma receptors. J Immunol 176 (12): 7598-604, 2006.
71. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-73, 1986.
72. Neurath MF, Wanitschke R, Peters M, Krummenauer F, Meyer zum Buschenfelde KH, Schlaak JF. Randomised trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine for treatment of chronic active Crohn's disease. Gut 44 (5): 625-8, 1999.
73. Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. Curr Opin Gastroenterol 21 (6): 687-91, 2005.
74. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature 411 (6837): 603-6, 2001.
75. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. J Biol Chem 276 (7): 4812-8, 2001.
76. P. E. Petrides SA. Biochemie und Pathobiochemie. Vol. 7. Berlin: Springer, 2003.
77. Pai JK, Mukamal KJ, Rexrode KM, Rimm EB. C-Reactive Protein (CRP) Gene Polymorphisms, CRP Levels, and Risk of Incident Coronary Heart Disease in Two Nested Case-Control Studies. PLoS ONE 3 (1): e1395, 2008.
78. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH, Tracy RP. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. Atherosclerosis 154 (3): 681-9, 2001.
79. Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, Geraghty D, Groh V, Spies T, Jabri B, Mayer L. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. Inflamm Bowel Dis 13 (3): 298-307, 2007.
80. Peyrin-Biroulet L, Chamaillard M. NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. J Endotoxin Res 13 (3): 135-9, 2007.
81. Prescott NJ, Fisher SA, Franke A, Hampe J, Onnie CM, Soars D, Bagnall R, Mirza MM, Sanderson J, Forbes A, Mansfield JC, Lewis CM, Schreiber S, Mathew CG. A nonsynonymous SNP in ATG16L1 predisposes to ileal Crohn's disease and is independent of CARD15 and IBD5. Gastroenterology 132 (5): 1665-71, 2007.
82. Radlmayr M, Torok HP, Martin K, Folwaczny C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. Gastroenterology 122 (7): 2091-2, 2002.

83. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell 118 (2): 229-41, 2004.

84. Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA. Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. Am J Hum Genet 66 (6): 1863-70, 2000.

85. Russell AI, Cunninghame Graham DS, Shepherd C, Roberton CA, Whittaker J, Meeks J, Powell RJ, Isenberg DA, Walport MJ, Vyse TJ. Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus. Hum Mol Genet 13 (1): 137-47, 2004.

86. Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Lochs H, Lofberg R, Modigliani R, Present DH, Rutgeerts P, Scholmerich J, Stange EF, Sutherland LR. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. Gastroenterology 122 (2): 512-30, 2002.

87. Sands BE. Inflammatory bowel disease: past, present, and future. J Gastroenterol 42 (1): 16-25, 2007.

88. Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP. Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. Nat Genet 14 (2): 199-202, 1996.

89. Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. Gut 55 (6): 749-53, 2006.

90. Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Annu Rev Microbiol 31: 107-33, 1977.

91. Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E, Lohse P, Goke B, Brand S. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease activity and IL23R genotype status. Inflamm Bowel Dis 14 (2): 204-12, 2008.

92. Schreiber S, Rutgeerts P, Fedorak RN, Khaliq-Kareemi M, Kamm MA, Boivin M, Bernstein CN, Staun M, Thomsen OO, Innes A. A randomized, placebo-controlled trial of certolizumab pegol (CDP870) for treatment of Crohn's disease. Gastroenterology 129 (3): 807-18, 2005.

93. Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Goke B, Lohse P, Ochsenkuhn T. 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 restenosis. Scand J Gastroenterol 41 (12): 1421-32, 2006.

94. Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. Gut 52 (2): 237-42, 2003.

95. Shi HN, Walker A. Bacterial colonization and the development of intestinal defences. Can J Gastroenterol 18 (8): 493-500, 2004.

96. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). Gut 39 (5): 690-7, 1996.

97. Shrive AK, Cheetham GM, Holden D, Myles DA, Turnell WG, Volanakis JE, Pepys MB, Bloomer AC, Greenhough TJ. Three dimensional structure of human C-reactive protein. Nat Struct Biol 3 (4): 346-54, 1996.

98. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Pena AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. 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 19 Suppl A: 5-36, 2005.

99. Solem CA, Loftus EV, Jr., Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 11 (8): 707-12, 2005.

100. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 122 (1): 44-54, 2002.

101. Tan SS, Ng PM, Ho B, Ding JL. The antimicrobial properties of C-reactive protein (CRP). J Endotoxin Res 11 (4): 249-56, 2005.

102. Tchernof A, Nolan A, Sites CK, Ades PA, Poehlman ET. Weight loss reduces C-reactive protein levels in obese postmenopausal women. Circulation 105 (5): 564-9, 2002.

103. Thomas L. Labor und Diagnose. Vol. 4. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft mbH, 1995.

104. Tillet WS FTJ. Serological reactions in pneumonia with a non-protein fraction of pneumococcus. J Exp Med 52: 561-571, 1930.

105. 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 5 (2): 79-84, 1999.

106. Toy LS, Yio XY, Lin A, Honig S, Mayer L. Defective expression of gp180, a novel CD8 ligand on intestinal epithelial cells, in inflammatory bowel disease. J Clin Invest 100 (8): 2062-71, 1997.

107. Tremelling M, Cummings F, Fisher SA, Mansfield J, Gwilliam R, Keniry A, Nimmo ER, Drummond H, Onnie CM, Prescott NJ, Sanderson J, Bredin F, Berzuini C, Forbes A, Lewis CM, Cardon L, Deloukas P, Jewell D, Mathew CG, Parkes M, Satsangi J. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 132 (5): 1657-64, 2007.

108. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut 29 (7): 990-6, 1988.

109. van Hees PA, van Elteren PH, van Lier HJ, van Tongeren JH. An index of inflammatory activity in patients with Crohn's disease. Gut 21 (4): 279-86, 1980.

110. Wakefield AJ, Sawyerr AM, Hudson M, Dhillon AP, Pounder RE. Smoking, the oral contraceptive pill, and Crohn's disease. Dig Dis Sci 36 (8): 1147-50, 1991.

111. Weersma RK, Zhernakova A, Nolte IM, Lefebvre C, Rioux JD, Mulder F, van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Wijmenga C, Dijkstra G. ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. Am J Gastroenterol 103 (3): 621-7, 2008.

112. Wehkamp J, Salzman NH, Porter E, Nuding S, Weichenthal M, Petras RE, Shen B, Schaeffeler E, Schwab M, Linzmeier R, Feathers RW, Chu H, Lima H, Jr., Fellermann K, Ganz T, Stange EF, Bevins CL. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 102 (50): 18129-34, 2005.

113. Wicher J. C-reaktives Protein. In: Thomas L, ed. Labor und Diagnose. Vol. 6. Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, 2005.

114. Willot S, Vermeire S, Ohresser M, Rutgeerts P, Paintaud G, Belaiche J, De Vos M, Van Gossum A, Franchimont D, Colombel JF, Watier H, Louis E. No association between C-reactive protein gene polymorphisms and decrease of C-reactive protein serum concentration after infliximab treatment in Crohn's disease. Pharmacogenet Genomics 16 (1): 37-42, 2006.

115. Xavier RJ, Huett A, Rioux JD. Autophagy as an important process in gut homeostasis and Crohn's disease pathogenesis. Gut 57 (6): 717-20, 2008.

116. Zee RY, Hegener HH, Cook NR, Ridker PM. C-reactive protein gene polymorphisms and the risk of venous thromboembolism: a haplotype-based analysis. J Thromb Haemost 2 (8): 1240-3, 2004.

9 Danksagung

Allen voran danke ich Herrn PD Dr. med. Stephan Brand. Ihm verdanke ich Thema und Fragestellung der vorliegenden Arbeit. Als Doktorvater und Betreuer hat er mich jederzeit bestmöglich unterstützt.

Im molekularbiologischen Labor von Herrn Prof. Dr. med Peter Lohse durfte ich die experimentellen Arbeiten für diese Doktorarbeit durchführen. Die Hilfeleistung, die ich durch Prof. Lohse und seine Technischen Assistentinnen, Frau Pia Lohse und Frau Heike Rübsamen, erfahren habe war beispielhaft und herausragend – Vielen Dank für diese Mühe.

Frau Dr. rer. nat. Julia Diegelmann (geb. Dambacher) lieferte mir kompetenten Rat und Unterstützung bei allen Fragen zu PCR und Statistik. Die Dres. med Herr Fabian Schnitzler und Frau Tanja Staudinger leisteten mir Vorarbeit ohne die ich diese Arbeit nicht hätte beginnen können.

Herrn Dr. Crispin bin ich zu großem Dank für die Hilfe bei den Multivarianz-Analysen verpflichtet.

Frau Dr. med. Astrid Konrad und Frau Dr. rer. nat. Veronika Schachinger machten es mir möglich eine größere Anzahl an Patienten in diese Arbeit einzuschließen.

Schliesslich Danke ich Frau Simone Pfennig, ihr unermüdlicher Einsatz bei der Klassifizierung und Betreuung der Patienten in der CED-Ambulanz ist einzigartig.

10 Lebenslauf

Name:	Dominik Michael Thalmaier
Geburtsdatum/ort:	10.03.1980 in Peißenberg
Wohnort:	Von-Paris-Str.11
	86159 Augsburg

Schulbildung:

1987 bis 1991:	Grundschule St. Johann
1991 bis 200:	Gymnasium Weilheim

Zivildienst:

200 bis 2001:	Tabalugahof Peißenberg

Studium:

2001 bis 2006:	Studium der Humanmedizin an der
	Ludwig-Maximilians-Universität, München
09/2003:	Ärztliche Vorprüfung
11/2007:	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2007:	Approbation als Arzt

Puplikatiion:

08/2006: **Thalmaier D**, Dambacher J, Seiderer J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, Otte JM, Crispin A, Goke B, Ochsenkuhn T, Lohse P, Brand S. The +1059G/C polymorphism in the C-reactive protein (CRP) gene is associated with involvement of the terminal ileum and decreased serum CRP levels in patients with.Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2006 Oct 1;24(7):1105-15

Ärztliche Tätigkeit:

Seit 12/2007:	Abteilung für Innere Medizin
	Wertachklinik Schwabmünchen