Aus dem Institut für Klinische Chemie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Seidel

Untersuchung des *CARD15*-Gens in Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Colitis indeterminata und Korrelation des Genotyps mit dem Phänotyp

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

Vorgelegt von
Fabian Schnitzler
aus
Dachau

Jahr
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Peter Lohse
2. Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. A. Eigler
Mitberichterstatter:	Priv. – Doz. Dr. med. B. Rolf
	Prof. Dr. med. Th. Kirchner
Mitbetreuung durch den habilitierten Mitarbeiter:	Priv. – Doz. Dr. med. Thomas Ochsenkühn
Dekan:	Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	08.11.2007

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.Einleitung		**5**
1.1. Definition der Krankheitsbilder		**5**
1.1.1.	Morbus Crohn	5
1.1.1.1.	Lokalisation der Erkrankung	5
1.1.1.2.	Transmurale Entzündung	6
1.1.1.3.	Endoskopische Merkmale des Morbus Crohn	6
1.1.1.4.	Histologie	7
1.1.1.5.	Klinisches Erscheinungsbild	7
1.1.1.6.	Komplikationen	8
1.1.1.6.1.	Komplikationen *in situ*	8
1.1.1.6.1.1	Fisteln	8
1.1.1.6.1.2.	Stenosen	9
1.1.1.6.3.	Extraintestinale Komplikationen bzw. Manifestationen des Morbus Crohn	10
1.1.1.6.4.	Durch Malabsorption bedingte Komplikationen	10
1.1.1.6.4.1.	Gallensäurenverlust und Gallensteinbildung	10
1.1.1.6.4.2.	Osteoporose	11
1.1.1.6.4.3.	Oxalat- und Harnsäure-Nierensteine	11
1.1.1.6.4.4.	Vitamin B12	12
1.1.1.6.5.	Malignität des Morbus Crohn	12
1.1.1.6.6.	Mortalität des Morbus Crohn	13
1.1.2.	Colitis ulcerosa	13
1.1.2.1.	Klinisches Erscheinungsbild	14
1.1.2.1.1.	Milder Krankheitsverlauf	14
1.1.2.1.2.	Moderater Krankheitsverlauf	15
1.1.2.1.3.	Schwerer Krankheitsverlauf	15
1.1.2.1.4.	Initiales Krankheitsbild	15
1.1.2.2.	Komplikationen *in situ*	16
1.1.2.2.1.	Intestinale Blutungen	16
1.1.2.2.2.	Fulminante Colitis	16
1.1.2.2.3.	Strikturen	17
1.1.2.3.	Colitis ulcerosa und Colonkarzinom	17
1.1.3.	Colitis indeterminata	18
1.1.4.	Häufigkeiten	19
1.2. Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen		**20**
1.2.1.	Umweltfaktoren	20
1.2.2.	Rolle von Infektionen und der luminalen Darmflora in der Pathogenese der CED	21

1.3. Genetische Faktoren in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen 23

1.3.1. Ermittlung von Suszeptibilitätsgenen, die bei der Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung eine Rolle spielen 27
1.3.1.1. Die Kandidaten-Gen-Analyse 27
1.3.1.2. Screening des gesamten Genoms 28

1.4. Identifizierung des IBD1-Locus und des *CARD15*-Gens bzw. des NOD2–Proteins 29

1.4.1. Der IBD1-Locus 29
1.4.2. Das *CARD15*–Gen 30
1.4.3. Das NOD2–Protein 33

1.5. Beeinflussung des Phänotyps und des Krankheitsverlaufs des Morbus Crohn durch *CARD15*–Mutationen 34

1.6. Zielsetzung der Arbeit 35

2. Methoden 36

2.1. Studie I: "Homozygosity for the *CARD15* frameshift mutation 1007fs predicts early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis" 36

2.1.1. Studienpopulation 36
2.1.2. Diagnose der CED 37
2.1.3. Ermittlung der klinischen Daten bzw. des Phänotyps der Patienten 37
2.1.4. Ermittlung des *CARD15*-Genotyps 39
2.1.5. Statistische Auswertung 41

2.2. Studie II: "Eight novel *CARD15* variants detected by DNA sequence analysis of the *CARD15* gene in 111 patients with inflammatory bowel disease" 42

2.1.1. Studienpopulation 42
2.2.2. Strategie zur Detektion von Mutationen im *CARD15*–Gen 43
2.2.3. Isolierung der genomischen DNA, Amplifikation der DNA mittels PCR und Sequenzierung der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 44
2.2.4. Analyse der Aminosäureaustausche mittels der Berechnungen nach Dayhoff 46

2.3. Arbeitschritte im Labor 48

2.3.1. Isolierung genomischer DNA 48
2.3.2. Präzipitation der DNA mit Äthanol 48
2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase chain reaction) 49
2.3.3.1. Standardprotokoll für PCR-Reaktionen 51
2.3.4. Oligonukleotid-Primer 53
2.3.4.1. Synthese der Oligonukleotid-Primer 53
2.3.4.2. Verwendete Oligonukleotide 54
2.3.5. Agrosegel-Elektrophorese 54
2.3.6. Isolierung und Reinigung der PCR-Produkte 56
2.3.6.1. Direkte Aufreinigung der DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen 56
2.3.7. DNA-Sequenzierung 56

2.3.7.1. DNA-Sequenzreaktion 57
2.3.7.2. Reinigung der Sequenzreaktionsprodukte 59
2.3.7.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur DNA-Sequenzierung 60
2.3.7.4. Auswertung der Sequenzgele 61

3. Ergebnisse 63

3.1. Ergebnisse der Studie I:
"Homozygosity for the *CARD15* frameshift mutation 1007fs predicts early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis" 63

3.1.1. Genotyp-Phänotyp-Korrelation der drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens (p.R702W, kodiert von Exon 4, p.G908R, kodiert von Exon 8, und die Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11) 63

3.1.2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation einer Untergruppe von MC-Patienten mit einer Homozygotie für die Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11 69

3.1.3. Analyse einer Untergruppe von MC-Patienten, die zusammengesetzt heterozygote Träger der p.R702W-Mutation und der p.G908R-Mutation sind 79

3.2. Ergebnisse der Studie II:
"Eight novel *CARD15* variants detected by DNA sequence analysis of the *CARD15* gene in 111 patients with inflammatory bowel disease" 80

3.2.1. Neue *CARD15*-Varianten 80

3.2.2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit einer neuen *CARD15*-Variante 85

4. Diskussion 88

4.1.1. Kritische Beurteilung des Studiendesigns und der Auswahl des Patientenkollektivs 88

4.1.2. Häufigkeit der *CARD15*/NOD2–Varianten im untersuchten Patientenkollektiv 89

4.1.3. Allgemeine Vorgehensweise bei der Mutationsanalyse des *CARD15*-Gens 90

4.1.4. „Ileitis terminalis" und stenosierender Verlauf bei *CARD15*-Mutationsträgern mit Morbus Crohn 91

4.1. 5. Homozygote Träger der Insertionsmutation p.1007fs als Hochrisikogruppe von MC-Patienten und Assoziation mit einem sehr schweren Krankheitsverlauf 93

4.1. 6. Acht neue *CARD15*-Varianten sind bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert 96

4.2. Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen **101**

4.2.1. Toll-like-receptors (TLR): transmembranale Toxin–Rezeptoren 103
4.2.2. Die NOD-Familie (NOD1/NOD2): zytosolische Toxin–Rezeptoren 105
4.2.3. Die Signaltransduktion durch NOD1 und NOD2 106

4.3. Funktion des NOD2–Proteins in der intestinalen Mukosa **107**

4.4. Beeinflussung der Funktion des NOD2-Proteins durch Mutationen im *CARD15*-Gen **110**

4.5. Modelle zur Erklärung der Pathophysiologie des mutierten NOD2 **113**

4.5.1. Insuffiziente Immunabwehr des Epitheliums - erhöhte Permeabilität der Darmwand 115
4.5.2. Dysregulation des Interleukins IL-12 118
4.5.3. Vermehrte Synthese und Sekretion von IL-1β 119

4.6. Weitere Suszeptibilitätsgene, die mit einer Prädisposition für eine CED assoziiertv sind **122**

4.6.1. Das *DLG5*-Gen 123
4.6.2. Das *SCL22A4*- und das *SLC22A5*-Gen 123
4.6.3. Gene der HLA-Region 124
4.6.4. Das *TLR4*-Gen 125
4.6.5. Das *CARD4*-Gen 126
4.6.6. Andere Suszeptibilitätsgene 126

4.7. *CARD15*/NOD2 im klinischen Alltag: Nutzen für Diagnostik und Therapie einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung **127**

4.7.1. Der *CARD15*-Mutationsstatus bei Patienten mit Morbus Crohn – Vorhersage des Schweregrades der Erkrankung und des Krankheitsverlaufs 127
4.7.2. Der *CARD15*-Mutationsstatus bei Patienten mit „indeterminierter Colitis“ 128
4.7.3. Der *CARD15*-Mutationsstatus als prognostischer Parameter für das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie 130

5. Zusammenfassung **132**

6. Literaturverzeichnis **137**

7. Danksagung **180**

8. Veröffentlichungen **182**

9. Lebenslauf **185**

1. Einleitung

Die chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Darms (CED; "inflammatory bowel disease" (IBD)) sind charakterisiert durch eine chronische, schubförmig verlaufende Entzündung der Darmwand. Anhand unterschiedlicher klinischer Manifestationen und einer unterschiedlichen Ätiopathogenese lassen sich zwei Krankheitsbilder der CED beschreiben, der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (UC) (OMIM 266000; Silverberg et al. 2005).

1.1. Definition der Krankheitsbilder

1.1.1 Morbus Crohn

Das klinische Krankheitsbild des Morbus Crohn wurde erstmals 1932 schriftlich umfassend von Burill B. Crohn, Leon Ginzburg und Gordon Oppenheimer als „Enteritis regionalis“ in der Arbeit "Regional ileitis: a pathologic and clinical entity" im Journal der American Medical Association (JAMA) vorgestellt. Als Hauptlokalisation der Erkrankung wurde dabei das terminale Ileum angesehen (Crohn et al. 1932).

1.1.1.1. Lokalisation der Erkrankung

Der Morbus Crohn kann den gesamten Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Rektum befallen. Bei annähernd 80 % der Patienten ist der Dünndarm betroffen. Hauptmanifestationsort ist normalerweise das distale Ileum, wobei jedoch bei einem Drittel dieser Patienten isoliert das terminale Ileum befallen ist und man somit von einer reinen „Ileitis terminalis“ sprechen kann. Einen gleichzeitigen Befall des Dünndarms und des Colons im Sinne einer Ileocolitis weisen etwa 50 % der Patienten mit einem Morbus Crohn auf.

Bei einem Fünftel der Crohn-Patienten ist isoliert das Colon betroffen. Hier zeigen sich Gemeinsamkeiten mit der Colitis ulcerosa, deren Hauptlokalisationsort das distale Colon bzw. das

Rektum ist. Bei ungefähr der Hälfte der Crohn-Patienten mit reinem Colonbefall ist allerdings das Rektum nicht befallen, was die Differentialdiagnose zwischen Crohn und Colitis ulcerosa erleichtert.

Nur ein kleiner Prozentsatz der Crohn-Patienten zeigt einen Befall des oberen Gastrointestinaltraktes, während annähernd ein Drittel der Crohn-Patienten ein perianales Befallsmuster der Erkrankung aufweist.

1.1.1.2. Transmurale Entzündung

Charakterisiert ist der Morbus Crohn durch eine transmurale Entzündung des Intestinaltraktes, die alle Wandabschnitte von der Tunica mucosa bis zur Tunica serosa und sogar angrenzende Strukturen einbeziehen kann. Der Intestinaltrakt zeigt dabei ein diskontinuierliches, segmentales Befallsmuster (sogenannte "skip lesions") mit zwischengeschalteten unveränderten Abschnitten. Die transmurale Entzündung führt zu dem typischen makroskopischen Erscheinungsbild des Morbus Crohn mit ödematöser und fibrotischer Verdickung der Darmwand der betroffenen Segmente des Intestinaltraktes und der Ausbildung von Mikroperforationen der Darmwand, Fisteln, Fissuren, Fibrosierungen und Stenosen. Eine Penetration der Entzündung in benachbarte Strukturen kann hauptsächlich im Bereich des terminalen Ileums zur Ausbildung von entzündlichen Verbackungen einzelner Darmabschnitte, sogenannten Konglomerattumoren ("fibrostenotic lesions"), führen. Auch eine Abkapselung des Entzündungsprozesses mit konsekutiver Ausbildung von Abszessen ist typisch.

1.1.1.3. Endoskopische Merkmale des Morbus Crohn

Die Endoskopie des Gastrointestinaltraktes ist neben radiologischen Untersuchungsmethoden wie der Computer-Tomographie (CT) und der Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) die Untersuchungsmethode der Wahl zur Diagnosestellung eines Morbus Crohn. Die hohe Coloskopie mit Intubation des terminalen Ileums wurde im Jahre 1971 beschrieben (Watanabe et al. 1971). Als endoskopische Charakteristika des Morbus Crohn zeigen sich der diskontinuierliche Befall ("skip lesions"), aphtoide Läsionen, scharf begrenzte, landkartenähnliche Ulzera oder unregelmäßig länglich

geformte Ulzerationen ("snail trails" = Schneckenspuren), Strikturen, ein Pflastersteinrelief der Schleimhaut ("cobble-stone-pattern") und kleinste hämorrhagische Läsionen ("pin-point-lesions"). Mit der Entnahme von multiplen Darmwandproben in den betroffenen Segmenten (Probe-Exzisionen, PEs) zur histologischen Untersuchung wird die Verdachtsdiagnose eines Morbus Crohn weiter gesichert (Pera et al. 1987, Waye et al. 1977, Waye et al. 1990, Coremans et al. 1984).

1.1.1.4. Histologie

Histologisch zeigen sich in 40 % der Fälle Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen, dabei in 70 % mit einer Hyperplasie der zugehörigen Lymphknoten. Weitere histologische Merkmale sind Lymphangiektasien und aphtenähnliche Geschwüre der Schleimhaut mit Fissuren und Fistelbildung (Yantiss et al. 2006).

1.1.1.5. Klinisches Erscheinungsbild

Bedingt durch das stark variable Ausmaß des Befalles des Gastrointestinaltraktes und den transmuralen Charakter des Entzündungsprozesses präsentiert sich der Morbus Crohn mit einem deutlich variableren klinischen Erscheinungsbild als die Colitis ulcerosa.

Klinische Hauptsymptome des Morbus Crohn mit geringer Spezifität sind Abdominalschmerzen und langanhaltende Durchfälle (meist ohne Blutbeimengung), Meteorismus und Flatulenz, Abgeschlagenheit und Müdigkeit, Gewichtsverlust und Fieber (Mekhjian et al. 1979).

Die Symptome ähneln dabei häufig denen einer Appendizitis mit kolikartigen Schmerzen im rechten Unterbauch, die aber bei einem Befall höherer Darmabschnitte auch weiter kranial lokalisiert sein können. Oft lässt sich auch eine schmerzhafte Resistenz tasten.

Allerdings haben bis zu 10 % der Crohn-Patienten keine Durchfälle. Bei Kindern können Wachstumsstörungen im Sinne eines retardierten Wachstums hinweisend auf einen Morbus Crohn sein, lange bevor sich die oben genannten typischen, aber unspezifischen Symptome manifestieren.

Auch das Auftreten von Fisteln (vor allem Analfisteln) oder/und Abszessen (v. a. anorektale Abszesse) ist bei vielen Patienten Erstsymptom der Erkrankung.

Das Auftreten klinischer Symptome kann einer Diagnosestellung oft jahrelang vorausgehen (Farmer et al. 1975, Pimentel et al. 2000). Eine Studie von Pimentel et al. konnte bei 45 Patienten mit Morbus Crohn und 21 Patienten mit Colitis ulcerosa zeigen, dass unspezifische Symptome, wie sie für ein Reizdarmsyndrom charakteristisch sind, bei den Crohn-Patienten im Mittel 7,7 Jahre vor der Diagnosestellung eines Morbus Crohn auftraten, während bei den Colitis ulcerosa-Patienten der Abstand vom ersten Auftreten der Symptome bis zur Diagnosestellung im Mittel nur 1,2 Jahre betrug (Pimentel et al. 2000).

1.1.1.6. Komplikationen

Der Morbus Crohn ist mit zahlreichen Komplikationen assoziiert: mit Komplikationen in situ, mit extraintestinalen Manifestation der Erkrankung sowie mit Komplikationen, die durch eine Malabsorption bedingt sind.

1.1.1.6.1. Komplikationen *in situ*

Hierbei handelt es sich Komplikationen, die direkt von den betroffenen Abschnitten des Intestinaltraktes ausgehen, wie zum Beispiel Fisteln, Stenosen, die Bildung von Konglomerattumoren und die Darmwandperforation.

1.1.1.6.1.1. Fisteln

Eine amerikanische Studie von Schwartz et al. aus dem Jahre 2002 berechnete das kumulative Risiko einer Fistelbildung bei Patienten mit Morbus Crohn (Schwartz et al. 2002). Patienten mit 10-jähriger Krankheitsdauer wiesen dabei ein kumulatives Risiko von 33 % für eine Fistelbildung auf, wobei das Risiko bei 20-jähriger Krankheitsdauer sogar 50 % betrug. Die klinische Symptomatik hängt einerseits

davon ab, von welchem Abschnitt des Gastrointestinaltraktes die Fistel ausgeht und andererseits von der weiteren intra- oder extraintestinalen Struktur, die dabei involviert ist. Dabei bleiben entero-enterische (Darm-Darm-) Fisteln oft asymptomatisch oder sind als palpable Resistenz zu tasten. Folgen von entero-vesikalen Fisteln (Darm-Blasen-Fisteln) sind oft rezidivierende Harnwegsinfektionen durch multiple Erreger sowie eine Pneumaturie. Entero-peritoneale Fisteln (meist Darm-Retroperitoneum) führen möglicherweise zur Bildung von Psoas-Abszessen und/oder zu Obstruktionen der Ureter mit konsekutiver Entwicklung einer Hydronephrose der betroffenen Niere. Abgang von Darmgas oder Fäces durch die Vagina resultieren aus entero-vaginalen Fisteln. Häufig leiden Crohn-Patienten unter kosmetisch außerordentlich entstellenden entero-kutanen Fisteln, wobei der Darminhalt direkt auf die Hautoberfläche drainiert wird.

1.1.1.6.1.2. Stenosen

Bei Befall des Dünndarmes durch den Morbus Crohn ist eine Obstruktion/Stenosierung die häufigste Indikation für eine operative Intervention. Die Obstruktion entsteht im Rahmen einer Inflammation und der Ausbildung eines Ödems in bereits verengten Darmabschnitten. Dabei kann es sich oft nur um eine partielle und auch temporäre Obstruktion des Darmlumens handeln, gerade dann, wenn der Ödembildung und der Entzündung therapeutisch schon entgegengewirkt wurde. Durch fibrosierende Prozesse verläuft die Stenosierung des Darmlumens allerdings zumeist langsam, aber progressiv ab. Eine plötzliche und komplette Obstruktion des Darmlumens wird dagegen sehr häufig bei Entzündungsprozessen mit einer Adhäsion von Darmschlingen mit konsekutiver Verbackung und der Ausbildung von sogenannten Konglomerattumoren beobachtet. Studien, die den Krankheitsverlauf bei Patienten mit einem Morbus Crohn über mehrere Jahre retrospektiv untersuchten, konnten bei 27 – 33 % der Crohn-Patienten einen stenosierenden Verlauf der Erkrankung beobachten (Louis et al. 2001, Freeman 2001).

1.1.1.6.3. Extraintestinale Komplikationen bzw. Manifestationen des Morbus Crohn

Extraintestinale Manifestationen des Morbus Crohn betreffen vor allem die Haut, die Augen, die Gelenke und die Leber, aber auch das Gefäßsystem und die Nieren (Danese et al. 2005):

- Haut: vor allem Zinkmangeldermatosen (Akrodermatitis enteropathica), Aphten, Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum (Farmer et al. 1975);
- Augen: vor allem Episkleritis, Iritis, Uveitis und Keratitis (Petrelli et al. 1982);
- Gelenke: Arthritis vor allem der großen Gelenke ohne Destruktion der Synovialis, undifferenzierte Spondylarthropathien und ankylosierende Spondylitis (meist HLA-B27-positiv) (Holden et al. 2003, Wordsworth 1998);
- Leber: primär sklerosierende Cholangitis (PSC) seltener als bei der Colitis ulcerosa (Rasmussen et al. 1997);
- vaskulär: venöse und arterielle Thrombembolien (Bernstein et al. 2001b, Solem et al. 2004, Irving et al. 2005);
- renal: sekundäre Amyloidose der Nieren mit Entwicklung einer Niereninsuffizienz (Gitkind et al. 1990).

1.1.1.6.4. Durch Malabsorption bedingte Komplikationen

Im Falle eines ausgedehnten Ileumbefalles und einer hohen Aktivität des Morbus Crohn oder postoperativ nach ausgedehnten Ileumresektionen kommt es zu Resorptionsstörungen von Stoffen, die im distalen Ileum resorbiert werden (Danese et al. 2005).

1.1.1.6.4.1. Gallensäurenverlust und Gallensteinbildung

Gallensäuren werden im distalen Ileum resorbiert und unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf. Geringe Gallensäureverluste führen über hygroskopische Effekte der Gallensäuren auf das

intraluminale Wasser und auf die Resorption von Elektrolyten zu wässriger Diarrhoe. Im Rahmen eines ausgeprägten Gallensäureverlustes kommt es jedoch durch eine gestörte Mizellenbildung zu einer zunehmenden Malabsorption von Fetten und damit letztendlich zu einer ausgeprägten Steatorrhoe. Zudem führt die geringere Resorption der Gallensäuren über eine Zunahme des relativen Cholesterinanteils in der Galle zu einer Erhöhung der Lithogenität der Galle und prädisponiert damit zur Bildung von Cholesterin-Gallensteinen.

Auch ein gestörter Bilirubin-Stoffwechsel scheint bei der Gallensteinformation involviert zu sein, wobei es zu einer vermehrten Bildung von Pigmentsteinen kommt (Hutchinson et al. 1994).

1.1.1.6.4.2. Osteoporose

Die Steatorrhoe kann zu einer schweren Malnutrition führen, verbunden mit Osteomalazie, Hypokalzämie (mit möglicher Entwicklung einer Tetanie) und einem erhöhten Risiko der Entwicklung einer Osteoporose (Silvennoinen et al. 1995). Betroffene Patienten haben ein erhöhtes Frakturrisiko, wobei dieses in einzelnen Studien variiert und zumindest teilweise vom Aktivitätsgrad der Erkrankung abhängig ist (Bernstein et al. 2000, Vestergaard et al. 2000, Loftus et al. 2002).

Der Verlust von Knochensubstanz wird dabei hauptsächlich bedingt durch die Einnahme von Steroiden im Rahmen der Crohn-Therapie und durch eine verminderte Vitamin D- und Calciumresorption. Letzteres resultiert aus einer Abnahme der physischen Aktivität und einem gestörten Gleichgewicht im Sexualhormonhaushalt mit einem relativen Östrogenmangel (Silvennionen et al. 1995, Semeao et al. 1997).

1.1.1.6.4.3. Oxalat- und Harnsäure-Nierensteine

Diarrhoe und Steatorrhoe fördern die Bildung von Calciumoxalat- (Whewellit und Wedellit) und Harnsäuresteinen (Obialo et al. 1991). Die Steatorrhoe führt über zwei Mechanismen zu einer erhöhten Oxalatabsorption im Darm und damit zu einer Hyperoxalurie. Eine Erhöhung der Konzentration an freien ungebundenen Fettsäuren im Darmlumen führt zu einer vermehrten Bindung

von freiem Calcium an die Fettsäuren und damit zu einer vermehrten Freisetzung von Oxalat, das absorbiert wird. Durch eine Erhöhung der Konzentration an Gallensäuren im Darmlumen kommt es zu einer Permeabilitätszunahme der Darmwand für kleine Moleküle wie zum Beispiel Oxalat (Obialo et al. 1991, Kathpalia et al. 1984).

Eine auf dem intraluminalen Volumenverlust basierende Dehydratation führt zur Ausscheidung eines immer geringer werdenden Urinvolumens und eine Erniedrigung des Urin-pHs. Beide Faktoren führen zu einer Reduzierung der Citrat-Ausscheidung über die Nieren mit einer konsekutiv erhöhten Prädisposition für die Bildung von Harnsäuresteinen (Obialo et al. 1991).

1.1.1.6.4.4. Vitamin B12

Vitamin B12 wird ebenfalls im distalen Ileum absorbiert. Ein hoher Aktivitätsgrad des Morbus Crohn im Ileum bzw. ausgedehnte Ileumresekionen führen über eine Vitamin B12-Malabsorption und den resultierenden Vitamin B12-Mangel zum klinischen Bild der perniziösen Anämie (Danese et al. 2005).

1.1.1.6.5. Malignität des Morbus Crohn

Bei einem ausgedehnten Befall des Kolons durch den Morbus Crohn scheint das Risiko für die Entstehung eines Colonkarzinoms nicht nur bei der Colitis ulcerosa, sondern auch beim Morbus Crohn erhöht zu sein (Choi et al. 1994). Bei gleicher Ausdehnung und gleicher Krankheitsdauer kann dieses Risiko genauso hoch sein wie bei der Colitis ulcerosa (Choi et al. 1994).

Im Vergleich zur Normalbevölkerung ist die Inzidenz von Dünndarmtumoren bei Patienten mit Morbus Crohn ebenfalls erhöht. Da Dünndarmtumore generell extrem selten auftreten, ist die Anzahl von Crohn-Patienten mit Dünndarmtumoren ebenfalls sehr klein. Ein vermehrtes Auftreten von "squamous cell carcinoma", Neoplasien des Duodenums, und von Lymphomen wurde bei Crohn-Patienten zwar berichtet, aber nicht eindeutig gesichert. Studien, die die Inzidenz von Lymphomen bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersuchten, berichteten von einem relativen Risiko zwischen 0.4 und 2,4 % (Lewis et al. 2001, Ekbom et al. 1991b, Persson et al. 1994,

Karlen et al. 1999, Palli et al. 2000, Loftus et al. 2000, Bernstein et al. 2001a). Betrachtet man diese Ergebnisse im Überblick, so ist ein erhöhtes Risiko der Entstehung von Lymphomen bei CED-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung nicht sicher belegt (Loftus et al. 2001).

1.1.1.6.6. Mortalität des Morbus Crohn

Studien, die die Lebenserwartung bei Patienten mit Morbus Crohn untersuchten, brachten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Dies spiegelt wiederum die Heterogenität des Krankheitsverlaufs wider, aber auch starke Unterschiede in der Datenerhebung bei den untersuchten Patientenkohorten wie zum Beispiel im Follow-up (Weedon et al. 1973, Prior et al. 1981, Weterman et al. 1990, Persson et al. 1996, Loftus et al. 1998, Palli et al 1998, Ekbom et al. 1992, Probert et al. 1992b, Jess et al. 2002, Card et al. 2003). Wahrscheinlich beschreiben Schätzungen der standardisierten Mortalitäts-Ratios aus populationsbasierten Studien am besten die Gesamtmortalität aus Patientenkohorten mit einem sehr unterschiedlichen Krankheitsverlauf des Morbus Crohn. Die Schätzungen gehen dabei von einem nicht erhöhten Risiko bis zu einem 5fach höheren Risiko für MC-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung aus, an den Folgen der Erkrankung wie zum Beispiel auftretende Komplikationen zu versterben (Probert et al. 1992b, Jess et al. 1992).

Allerdings scheint es in Anbetracht der Ergebnisse all dieser Studien angemessen zu sein, wenn man bei einem Morbus Crohn nur eine geringfügig, im schlimmsten Falle moderat sinkende Lebenserwartung annimmt.

1.1.2. Colitis ulcerosa

Im Gegensatz zum Morbus Crohn ist die Colitis ulcerosa charakterisiert durch immer wiederkehrende Entzündungsepisoden, die isoliert die Mukosa und Submukosa des Colons betreffen. Das Rektum ist fast ausnahmslos in den Entzündungsprozess involviert, wobei sich die Entzündung kontinuierlich nach proximal ausdehnen und andere Colonabschnitte mit einbeziehen kann (Silverberg et al. 2005).

Je nach Ausdehnungsgrad des Entzündungsprozesses wird die Colitis ulcerosa unterschiedlich beschrieben:

- Proktitis im Sinne einer auf das Rektum limitierten Entzündung;
- distale Colitis oder Proktosigmoiditis, wenn sich der Entzündungsprozess maximal bis zum mittleren Sigmoid ausdehnt;
- linksseitige Colitis bei Ausdehung des Entzündungsprozesses bis zur linken Colonflexur;
- ausgedehnte Colitis, wenn der Entzündungsprozess über die rechte Colonflexur nach proximal, aber nicht bis zum Coecum reicht;
- Pancolitis bei Ausdehnung der Entzündung bis zum Coecum.

1.1.2.1. Klinisches Erscheinungsbild

Die Colitis ulcerosa manifestiert sich mit sehr unterschiedlicher Symptomatik bei den betroffenen Patienten. Hinsichtlich der Prognose und Therapie scheint es sinnvoll zu sein, die Erkrankung in unterschiedliche Grade einzuteilen: mild, moderat und schwer (Silverberg et al. 2005).

1.1.2.1.1. Milder Krankheitsverlauf

Ein milder Verlauf der Colitis ulcerosa wird hauptsächlich bei Patienten mit Begrenzung des Entzündungsprozesses auf das Rektum (Proktitis) oder auf das Rektosigmoid (distale Colitis oder Proktosigmoiditis) beobachtet. Die Patienten klagen über intermittierende rektale Blutungen, teils mit Schleimabgang und geringer Diarrhoe mit weniger als vier lockeren Stühlen pro Tag. Weiterhin gehören Tenesmen und Phasen der Obstipation wie auch geringe abdominelle Krämpfe zur Symptomatik des milden Krankheitsverlaufes. Schwere abdominelle Krampfattacken, ausgedehnte Darmblutungen, Fieber und Gewichtsverlust werden dagegen beim milden Verlauf der Colitis ulcerosa nicht beobachtet.

1.1.2.1.2. Moderater Krankheitsverlauf

Ein moderater Krankheitsverlauf wird anatomisch charakterisiert durch eine Ausdehnung des Entzündungsprozesses mindestens bis zur linken Colonflexur (linkseitige Colitis). Klinisch steht eine Diarrhoe mit bis zu 10 lockeren blutigen Stuhlgängen pro Tag im Vordergrund. Daneben wird eine geringe, nicht substitutionsbedürftige Anämie beobachtet, außerdem zunehmende Bauchschmerzen und subfebrile Temperaturen. Eine adäquate Ernährungsumstellung ist normalerweise von Nöten.

1.1.2.1.3. Schwerer Krankheitsverlauf

Bei Patienten mit einem schweren oder fulminanten Krankheitsverlauf dehnt sich der Entzündungsprozess bis proximal der linken Colonflexur und teils bis zum Coecum hin aus (ausgedehnte Colitis bzw. Pancolitis). Klinisch steht hierbei typischerweise eine Diarrhoe mit mehr als 10 blutigen Stuhlgängen sehr niedriger Konsistenz mit starken abdominellen Krämpfen, Fieber bis zu 39.5 °C und starken, substitutionsbedürftigen Blutungen im Vordergrund. Oft leiden die Patienten unter starkem Gewichtsverlust und einem schlechten Ernährungszustand.

Bei einem schweren Krankheitsverlauf kann sich der Entzündungsprozess nicht nur horizontal im Darm ausbreiten, sondern auch vertikal voranschreiten, die Tunica mucosa überschreiten und die Tunica muscularis propria penetrieren. In dieser Situation wird die Darmmotilität gestört, das Colon dilatiert und die Peristaltik nimmt ab oder kommt zum Erliegen, mit konsekutiver Entwicklung eines toxischen Megakolons. Bei progressiver Ausdehnung der Entzündung bis zur Tunica serosa besteht die Gefahr einer Darmperforation (Greenstein et al. 1985, Jalan et al. 1969).

1.1.2.1.4. Initiales Krankheitsbild

Die initiale Entzündungsepisode ist bei einem Drittel der Patienten auf das Rektum oder das distale Colon limitiert. Bei einem weiteren Drittel betrifft die Entzündung das Colon bis zur rechten Colonflexur (linksseitige Colitis), und bei den meisten der verbleibenden Patienten ist das gesamte

Colon bis zum Coecum im Sinne einer Pancolitis betroffen. Bei weniger als 10 % der Patienten manifestiert sich die Colitis ulcerosa initial mit einem fulminanten Krankheitsverlauf. Manchmal geht dieser Manifestationform eine sich selbst limitierende Phase einer rektalen Blutung voraus, die Wochen bis Monate vorher auftreten kann.

Die körperliche Untersuchung ist oft noch beim ersten Auftreten von Symptomen relativ unauffällig. Möglicherweise wird eine Blässe des Patienten beobachtet. Weitere Hinweise sind ein Gewichtsverlust oder der Nachweis von frischem Blut bei der rektalen Untersuchung.

1.1.2.2. Komplikationen *in situ*

Zu den lokalen Komplikationen der Colitis ulcerosa gehören massive Hämorrhagien, ein fulminanter Verlauf der Colitis, intestinale Perforationen und Strikturen und die Entstehung eines Colonkarzinoms.

1.1.2.2.1. Intestinale Blutungen

Bei bis zu 3 % der Patienten mit Colitis ulcerosa treten massive Hämorrhagien auf, die zu einer notfallmäßigen Colektomie führen können (Becker 1992).

1.1.2.2.2. Fulminante Colitis

Ein fulminanter Verlauf der Erkrankung wird bei bis zu 15 % der Colitis ulcerosa-Patienten beobachtet, wobei bis zu 20 % dieser Patienten ein toxisches Megakolon entwickeln, mit konsekutiv erhöhtem Risiko einer Darmperforation und tödlichem Krankheitsverlauf (Danovitch 1989). Eine Perforation mit begleitender Peritonitis wurde dabei mit einer 50 %igen Mortalität assoziiert.

1.1.2.2.3. Strikturen

Benigne Strikturen können durch intermittierende Entzündungsepisoden entstehen, oder auch in manchen Fällen durch eine Muskelhypertrophie bedingt sein. Ungefähr 10 % der Patienten mit Colitis ulcerosa haben Strikturen, vorzugsweise im Bereich des Rektumsigmoids, dabei oft verbunden mit einer Obstruktionssymptomatik. Strikturen, die im Rahmen der Colitis ulcerosa auftreten, sollten solange als maligne betrachtet werden, bis nicht das Gegenteil durch eine endoskopische Evaluation einschließlich Biopsie bewiesen worden ist. Eine OP ist bei Strikturen indiziert, die eine anhaltende Obstruktionssymptomatik verursachen, oder wenn eine Malignität nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

1.1.2.3. Colitis ulcerosa und Colonkarzinom

Eine weitere schwerwiegende Komplikation kann durch das erhöhte Potential der Colitis ulcerosa für die Entwicklung eines Colonkarzinoms entstehen. Das Risiko für ein Colonkarzinom korreliert dabei erstens mit der Dauer und zweitens mit dem Ausdehnungsgrad der Colitis ulcerosa (Devroede et al. 1971, Mir-Madjlessi et al. 1986, Brostrom et al. 1987, Gilat et al. 1988; Ekbom et al. 1990; Stewenius et al. 1995). Im Vergleich zur Normalbevölkerung beginnt die Inzidenz des Colonkarzinoms bei Patienten mit Befall der Abschnitte proximal der rechten Kolonflexur (ausgedehnte Colitis bzw. Pancolitis) nach 7 bis 8 Jahren Krankheitsdauer anzusteigen. Nach diesem Zeitraum wächst das relative Risiko für die Entwicklung eines Colonkarzinoms um 0,5 % pro Jahr. Nach 30 Jahren Krankheitsdauer beträgt das kummulative Risiko eines colorektalen Karzinoms zwischen 0 % und 12 % bei einer distalen Proctocolitis und zwischen 4 % und 47 % bei einer Pancolitis. Bei Colitis ulcerosa–Patienten mit einem Colonkarzinom in der Familienanamnese ist das Risiko ebenfalls erhöht (Nuako et al. 1998, Eaden et al. 2000).

1.1.3 Colitis indeterminata

5-20 % der Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) und einer chronischen Entzündungsreaktion vorzugsweise im Colon, also einer reinen Colitis ohne Beteiligung des Dünndarmes, können trotz des klinischen Erscheinungsbildes und trotz der Befunde aus radiologischen, endoskopischen und histologischen Untersuchungen keiner der beiden Hauptformen der CED, also dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa, zugeordnet werden (Lee et al. 1979, Hildebrand et al. 1991, Moum et al. 1997, Ekbom 2000; Geboes et al. 2003; Guindi et al. 2004; Hale et al. 2004; Hildebrand et al. 2003, Stewenius et al. 1995). Bei diesen Patienten wird dann von einer sogenannten „indeterminierten Colitis“ gesprochen, wie sie im Jahre 1978 in England im St. Mark´s Hospital erstmals beschrieben wurde (Price 1978). Der Begriff „indeterminierte Colitis“ wurde dabei von dem Pathologen Ashley Price bei der Beurteilung von Präparaten aus chirurgischen Eingriffen für überlappende Charakteristika beider CED-Hauptformen verwendet. Ursprünglich wurde von einer temporären Diagnosestellung ausgegangen, und es wurde angenommen, dass die Mehrzahl dieser IC-Patienten im weiteren Krankheitsverlauf entweder der Erkrankung des Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa zugeordnet werden könnten (Hildebrand et al.1991, Moum et al. 1997, Meucci et al. 1999).

Charakterisiert ist die indeterminierte Colitis durch eine Entzündung der Darmwand des Colons. Typisch dabei ist, dass durch die Endoskopie einschliesslich der Probeexzision nur uneindeutige Befunde ermittelt werden können. Die mikroskopische Aufarbeitung der Gewebeproben zeigt eine gestörte Architektur der intestinalen Mukosa des Colons (mehr als 10 % der Krypten) und eine inkonsistent auftretende akute oder chronische Entzündung der Darmwand, die auch histologisch weder dem Morbus Crohn noch der Colitis ulcerosa eindeutig zugeordnet werden kann.

Andere Ursachen der Colitis, einschliesslich einer infektiösen, müssen bei der Diagnose „índeterminierte Colitis“ durch Stuhlkulturen und histologische Untersuchungen ausgeschlossen werden (Le Berre et al. 1995; Tsang et al. 1999; Nostrant et al. 1987, Mottet 1971).

Betrachtet man alle Charakteristika einer indeterminierten Colitis, dann kann sicherlich von einer einigermassen stabilen Erkrankung ausgegangen werden, die über einen längeren Zeitraum konstant zu bleiben scheint.

1.1.4. Häufigkeiten

Bei der Verteilung der Inzidenzen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen konnte ein globales Nord-Süd-Gefälle beobachtet werden. So wurden beispielsweise standardisierte Inzidenzraten zwischen 10.9 und 12.8 für die Colitis ulcerosa und zwischen 6.0 und 7.0 für den Morbus Crohn in Nordkalifornien und in Skandinavien beschrieben (Hiatt et al. 1988, Moum et al. 1997). Inzidenraten zwischen 2.0 und 6.3 für eine Colitis ulcerosa und zwischen 0.9 und 3.1 für einen Morbus Crohn wurden dagegen in der südlichen Hemisphäre beobachtet (Andres et al. 1999). Auch europäische Studien beschreiben ein Nord-Süd-Gefälle in den CED-Inzidenzraten, wobei hier Vergleiche zwischen den verschiedenen Studien aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns und der unterschiedlichen Auswertung der Daten schwierig sind (Orholm et al. 1991, Binder et al. 1982; Sinclair et al. 1983, Shivananda et al. 1996; Bjornsson et al. 2000; Trallori et al. 1996, Cottone et al. 1991, Ekbom et al. 1991a, Kyle 1992). Die Daten zeigen aber, dass die Inzidenz der CED im Norden von Europa 4 bis 5 mal höher ist als in den südlicher gelegenen Ländern. Die Inzidenz der „indeterminierten Colitis“ lag in europäischen Studien bei 2.4 pro 100000 Einwohner (Lee et al. 1979, Hildebrand et al. 1991, Moum et al. 1997, Ekbom A. 2000, Geboes et al. 2003, Guindi et al. 2004, Hale et al. 2004, Hildebrand et al. 2003, Stewenius et al. 1995).

Auch ethnische Differenzen spielen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen eine grosse Rolle (Silverberg et al. 2005). Epidemiologische Daten beschreiben zum Beispiel einheitlich höhere Inzidenzraten für Ashkenazi-Juden im Vergleich zu Bevölkerungsgruppen nicht-jüdischer Abstammung (Yang et al. 2001). Die höchsten Prävalenzen für eine sporadisch und auch für eine familär gehäuft auftretende CED wurden dementsprechend bei in Westeuropa und Nordamerika lebenden Ashkenazi-Juden gefunden (Roth et al. 1989). Die niedrigsten Prävalenzraten, die jemals in einer Bevölkerungsgruppe beobachtet wurden, traten dagegen bei Afro-Amerikanern auf (Russel et al. 2004).

1.2. Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen liegt wahrscheinlich eine sehr komplexe Ätiologie zugrunde, die im Wesentlichen auf dem Zusammenspiel dreier Hauptfaktoren basiert: erstens auf dem Einfluß von Umweltfaktoren, zweitens auf einer genetischen Prädisposition, und drittens spielen die intestinale Mikroflora und eine Dysregulation des Immunsystems eine wichtige Rolle (Fiocchi 1998, Elson 2002, Shanahan 2002, Podolsky 2002).

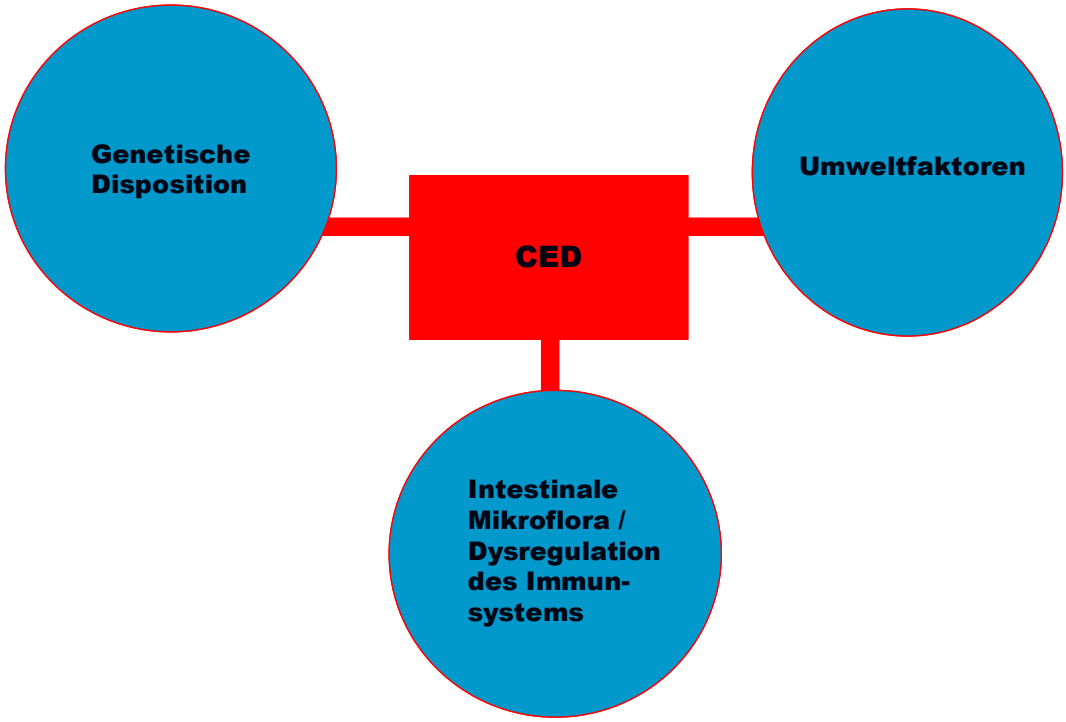


Abbildung 1.2.1: Zusammenspiel von genetischen Faktoren, von Umweltfaktoren und von Antigenen der intestinalen luminalen Bakterienflora in der Entstehung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.

1.2.1. Umweltfaktoren

Hinweise auf ein enges Zusammenspiel von Umweltfaktoren und einer genetischen Prädispostion geben Ergebnisse aus epidemiologischen Untersuchungen (Russel et al. 2004). Die zeitliche

Entwicklung der Inzidenzen, besonders die ansteigende Inzidenz der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Zeitraum der letzten drei Jahrzehnte bei jungen Menschen, kann beispielsweise nicht nur durch den alleinigen Einfluß von genetischen Faktoren erklärt werden (Russel et al. 2004).

Zum Beispiel haben die Rauchgewohnheiten der Patienten schon frühzeitig einen Einfluss auf die Krankheitsentstehung eines Morbus Crohn und auch einer Coloitis ulcerosa durch eine Veränderung der Prädisposition für diese Erkrankungen (Calkins 1989, Rubin et al. 2000). Dabei zeigen sich gegensätzliche Effekte. Bei einem Morbus Crohn ist Rauchen assoziiert mit einer erhöhten Prädisposition für die Erkrankung, im Falle der Erkrankung mit einem raschen, progredienten Krankheitsverlauf und einer häufigeren Notwendigkeit einer operativen Intervention und einer immunsuppressiven Therapie.

Dagegen scheint das Rauchen bei der Colitis ulcerosa hinsichtlich der Krankheitsentstehung protektiv zu wirken, wobei sogar Dosis-Wirkungs-Beziehungen ermittelt werden konnten. Da die meisten Kinder und Jugendlichen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der CED noch nicht rauchen, scheint hier das Passivrauchen eine größere Rolle zu spielen. Eine Studie von Lashner et al konnte zeigen, dass Rauchen zum Zeitpunkt der Geburt eher einen Risikofaktor für die Entstehung eines Morbus Crohn und auch einer Colitis ulcerosa darstellt als das Rauchen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der Erkrankung (Lashner et al. 1993).

1.2.2. Rolle von Infektionen und der luminalen Darmflora in der Pathogenese der CED

Auch Infektionen wurden als mögliche Ursache oder als Einflussfaktor für die Krankheitsenstehung der CED untersucht. Als eine spezifische Ursache der Entstehung eines Morbus Crohn wurden dabei Infektionen durch das *Mycobacterium paratuberculosis* und durch Masernviren diskutiert (Russel et al. 2004). Allerdings gibt es viele Kontroversen, und es konnte noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Rolle diese Mikroorganismen wirklich in der Pathogenese des Morbus Crohn spielen (Sartor 1997, Robertson et al. 2001, Chamberlin et al. 2001, Ghosh et al. 2001).

Interessanterweise scheinen Faktoren, die eine Übertragung von infektiösen Organismen begünstigen (niedriger Hygienestandard, schlechte sanitäre Infrastruktur oder eine Überbevölkerung in

manchen Regionen) bei der Krankheitsentstehung der CED eher protektiv zu wirken (Gent et al. 1994).

Den aussagekräftigsten Beweis für eine Beteiligung von Mikroorganismen an der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen liefert wohl die intestinale Darmflora selbst. In Tiermodellen einer Colitis, sei sie entweder chemisch induziert, das Ergebnis eines veränderten genetischen Konstruktes, oder spontan auftretend, ist das Vorhandensein der intestinalen Darmflora eine wichtige Vorraussetzung für die Manifestation und den Krankheitsausbruch der Colitis (Sellon et al. 1998).

Bestärkt bzw. komplementiert wird diese Beobachtung durch Ergebnisse aus zahlreichen klinischen Studien. Zum Beispiel werden durch eine Umleitung der Faeces über eine enterokutane Stomaanlage nach extrakorporal die nachgeschalteten betroffenen Darmabschnitte entlastet, wobei die Antigenkarenz in diesen Darmabschnitten einen günstigen Effekt auf den Entzündungsprozess hat (Winslet et al. 1994). Antibiotische und probiotische Therapien scheinen zudem mit steigendem Erfolg den Krankheitsverlauf der CED zu mildern und damit positiv zu beeinflussen (Hart et al. 2003).

Bei gesunden Individuen befindet sich die intestinale Mucosa in einem Zustand einer ständigen, aber kontrollierten physiologischen Entzündung, wobei eine Homöostase zwischen entzündlichen und antientzündlichen Mechanismen vorliegt (Shanahan 2002). Das Immunsystem der Mucosa kann dabei verglichen werden mit einem großen Sinnesorgan in ständiger Alarmbereitschaft, das seine Mikroumgebung ständig auf Antigene hin untersucht und diese kritisch interpretiert (Shanahan 2002). Zur Erhaltung der mucosalen Homöostase wird dabei eine ständige Reaktionsbereitschaft des Immunsystems auf Antigene der residenten intestinalen Mikroflora und auf Antigene aus der aufgenommenen Nahrung benötigt, bei gleichzeitiger effektiver Reaktionsfähigkeit des Immunsystems gegen episodisch auftretende Bedrohungen durch Pathogene.

Fehler bei der Interpretation und Regulation der immunologischen Wahrnehmung von Antigenen und der immunologischen Antwort darauf führen zu einer Störung der mucosalen Homöostase und prädisponieren den Organismus zu einer unkontrollierten bzw. einer pathologischen Entzündung des Darmes (Shanahan 2002).

Es hängt dabei von einer auf der genetischen Prädisposition des Individuums basierenden Anfälligkeit für eine immunologische Dysregulation ab, dass die normale, apathogene intestinale Darmbesiedlung durch Mikroorganismen zu einer antigenen Bedrohung wird und die Unterscheidung zwischen pathogenen und harmlosen Mikroorganismen durch das Immunsystem unmöglich wird.

Hierin liegt sicherlich ein Schlüssel zum Verständnis des Mechanismus der Zerstörung des Gewebes, die bei den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und speziell beim Morbus Crohn beobachtet wird (Shanahan 2002).

1.3. Genetische Faktoren in der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Ergebnisse epidemiologischer Untersuchungen lassen eine genetische Komponente bei der Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vermuten (Russel et al. 2004, Shanahan 2002). Im Besonderen geben starke Unterschiede in der Prädisposition für eine CED in ethnisch unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen, hohe Konkordanzraten bei Zwillingspaaren und eine Familienaggregation der CED Anlaß zur detaillierten Evaluierung genetischer Ursachen eines Morbus Crohn und einer Colitis ulcerosa (Russel et al. 2004).

Die Tatsache, dass Angehörige unterschiedlicher Bevölkerungsgruppen eine stark variable Prädisposition für eine CED haben, wurde in zahlreichen Studien dokumentiert (Russel et al. 2004). Dabei wurden die höchsten Prävalenzen für eine sporadisch auftretende CED und auch für eine familär gehäuft auftretende CED bei in Westeuropa und Nordamerika lebenden Ashkenazi-Juden beschrieben (Roth et al. 1989). Im Vergleich zwischen der jüdischen Bevölkerung und anderen Bevölkerungsgruppen, die im selben geographischen Raum leben, wurden bei der jüdischen Bevölkerungsgruppe konstant erhöhte Inzidenzraten (2 - 4 mal höher) und erhöhte Prävalenzraten (2,2 – 2,9 mal höher) für einen Morbus Crohn beobachtet (Rotter et al. 1992). Dies wurde als Beweis für eine genetische Prädisposition angesehen und führte zu der Annahme, dass das höhere Risiko der jüdischen Bevölkerung, an einem Morbus Crohn zu erkranken, zumindest teilweise auf genetische Ursachen zurückgeführt werden kann (Sugimura K et al. 2003). Die niedrigsten Prävalenzraten, die

jemals in einer Bevölkerungsgruppe beobachtet wurden, traten dagegen bei Afro-Amerikanern auf (Bonen et al. 2002).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass den unterschiedlichen Prävalenzraten einer CED in ethnisch unterschiedlichen Bevölkerungsgruppen ein Zusammenspiel zwischen Umweltfaktoren und genetischen Faktoren zugrunde liegt. Dies kann sehr gut bei asiatischen Einwanderern in England beobachtet werden. Epidemiologische Daten aus der Region Leicester zeigen, dass die in England lebende asiatische Bevölkerung eine deutlich höhere Prädisposition hat, an einer Colitis ulcerosa zu erkranken, als die in Asien heimische Bevölkerung (Probert et al. 1992a).

Die Konkordanzraten bei eineiigen und zweieiigen Zwillingen liefern weitere Beweise für eine Bedeutung von genetischen Faktoren, aber auch von Umweltfaktoren (Russel et al. 2004). Drei europäische Studien haben ingesamt über 326 Zwillingspaare berichtet (Orholm et al. 2000, Thompson et al. 1996, Tysk et al. 1988). Daten über den Verlauf sind aus der ersten Studie verfügbar (Halfvarson et al. 2003). Die Konkordanzraten für den Morbus Crohn betrugen 36 % und 4 % (eineiige beziehungsweise zweieiige Zwillingspaare) und entsprechend für die Colitis ulcerosa 16 % und 4 % (Orholm et al. 2000, Thompson et al. 1996, Tysk et al. 1988, Halfvarson et al. 2003). Noch höhere Konkordanzraten bei Zwillingspaaren mit Morbus Crohn sind beschrieben mit 44 % für eineiige Zwillingspaare und 3,8 % für zweieiige Zwillingspaare (Shanahan 2002). Diese Daten zeigen deutlich, daß der Einfluß der Gene beim Morbus Crohn eine wesentlich größere Rolle spielt als bei der Colitis ulcerosa. Der abgeleitete Koeffizient der Vererbung ist identisch mit dem anderer chronischer Erkrankungen des Kindesalters einschließlich dem insulinabhängigen Diabetes und dem Asthma bronchiale (Ahmad et al. 2001).

Auch die Prävalenzen einer familär gehäuft auftretenden CED wurden umfangreich untersucht (Russel et al. 2004). Dabei wird eindeutig klar, dass eine positive Familienanamnese der am besten nachweisbare Risikofaktor für die Krankheitsentstehung ist (Russel et al. 2004). Obwohl die Schätzungen stark variieren, zeigen sich in den durchgeführten Studien viele konstante Gemeinsamkeiten. Zwischen 6 % und 32 % der Patienten, die an einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung erkrankt sind, haben einen betroffenen Patienten in der Verwandtschaft (Ahmad et al. 2001). Dabei haben Geschwister das größte relative Risiko, an einer CED zu erkranken, wenn ein

Geschwister an einer CED leidet, mit abnehmendem relativem Risiko für Eltern, Nachkommen und Verwandte zweiten Grades. Beim Morbus Crohn wurde das relative Risiko für ein Geschwister eines MC-Patienten, im Vergleich zur Prävalenz in der Gesamtbevölkerung, zwischen 13 % und 36 % geschätzt (Russel et al. 2004). Die gleiche Konstellation erbrachte bei der Colitis ulcerosa ein relatives Risiko zwischen 7 % und 17 % (Russel et al. 2004). Wenn ein Kind Nachkomme zweier Eltern ist, die beide an einer CED leiden, liegt das relative Risiko für das Kind bei 33 %, bis zu einem Alter von 28 Jahren an einer CED zu erkranken (Lahaire et al. 2001). Diese Daten belegen einen starken Einfluss der Gene auf das CED-Risiko (Russel et al. 2004).

Eine Reihe von weiteren Besonderheiten aus den zahlreichen Studien über die familiär gehäuft vorkommende CED sei hier erwähnt. Es scheint erwiesen, dass Verwandte von MC-Patienten nicht nur eine erhöhte Prädisposition haben, an einem Morbus Crohn, sondern auch an einer Colitis ulcerosa zu erkranken, was wiederum die Hypothese stützt, dass es allgemeine Faktoren geben muss, die für beide Erscheinungsformen prädisponieren (Satsangi et al. 1994). Darüberhinaus scheint nicht nur die Prädiposition für eine Erkrankung, sondern auch der Krankheitsverlauf der CED einer familiären Vererbung unterworfen zu sein (Bayless et al. 1996). Auch scheint ein früher Krankheitsbeginn eher mit einem familiären Auftreten der CED assoziiert zu sein, und damit wahrscheinlich auch zumindest teilweise genetisch vorbestimmt zu sein. Sehr deutlich wird diese Assoziation, wenn man die Ergebnisse einer klinischen Studie, der Cleveland-Studie, betrachtet, in die eine große Anzahl von Patienten mit einem frühen Krankheitsbeginn eingeschlossen wurde, von denen 35 % eine positive Familienanamnese für eine CED aufwiesen (Farmer et al. 1980).

Die hier aufgeführten Studien zur Epidemiologie der CED sowie weitere Untersuchungen von verschiedenen internationalen Forschungsgruppen zur Ermittlung genetischer Einflüsse bei der Entstehung der CED (Yang et al. 2000, Schreiber 2000, Schreiber et al. 2005, Orchard et al. 2000, Taylor et al. 2003) verdeutlichen die enorme genetische Komplexität, die den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zugrunde liegt. Dennoch können durch diese Daten aber einige wichtige allgemeine Aussagen zur Genetik der CED gemacht werden (Shanahan 2002). Erstens scheint eine Verwandtschaft des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa auf genetischer Ebene ersichtlich zu sein, assoziiert mit multiplen Suszeptibilitätsgenen, wobei einige dieser Gene bzw. Genveränderungen für

beide Erkrankungen prädisponieren und einige andere entweder für einen Morbus Crohn oder aber für eine Colitis ulcerosa. Daher besteht normalerweise für Verwandte von mehrfach betroffenen Familien eine Konkordanz für eine der beiden Erscheinungsformen der CED. Es zeigte sich jedoch, dass Verwandte von MC-Patienten einerseits ein erhöhtes Risiko haben, an einem Morbus Crohn zu erkranken, aber andererseits auch ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Colitis ulcerosa.

Zweitens spielen genetische Faktoren beim Morbus Crohn eine größere Rolle als bei der Colitis ulcerosa. Der Grad eines familiären "clustering" ist beim Morbus Crohn ebenfalls höher.

Drittens kann anhand der enorm variierenden Erscheinungsformen der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen mit Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-typischen Krankheitsbildern, die bei genetisch veränderten Tieren induziert wurden, vermutet werden, dass beim Menschen eine ähnliche genetische Heterogenität vorliegt, wobei verschiedene genetische Faktoren zu einem ähnlichen klinisch-pathologischen Krankheitsbild führen können.

Viertens verdeutlichen Konkordanzraten von eineiigen Zwillingspaaren, dass eine geringe Penetranz bei der Vererbung der CED vorliegen muss, und dass bei der Krankheitsentstehung auch andere Ursachen wie zum Beispiel Umweltfaktoren eine Rolle spielen müssen.

Fünftens kann der Vererbungsmodus der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen nicht anhand eines einfachen Erbganges erklärt werden, da genetische Faktoren auf unterschiedlichen Ebenen wirksam werden, in der Immunantwort und innerhalb der intestinalen Mucosa. Darüberhinaus scheinen die Suszeptibiltätsgene und Gene, die die Erscheinungsform der CED vorbestimmen (Morbus Crohn vs. Colitis ulcerosa), sich von denjenigen Genen zu unterscheiden, die das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung bestimmen, wie zum Beispiel Ausdehnung und Schweregrad der CED oder das Ansprechen auf eine Therapie (Shanahan 2002).

1.3.1. Ermittlung von Suszeptibilitätsgenen, die bei der Entstehung einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung eine Rolle spielen

Zwei komplementäre Methoden wurden angewendet, um nach Suszeptibilitätsgenen für die chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen zu suchen: die Kandidaten-Gen-Analyse und das Screening des gesamten Genoms.

1.3.1.1. Die Kandidaten-Gen-Analyse

Die Analyse von sogenannten „Kandidaten-Genen“ beruht auf dem Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung. Basierend auf den Hypothesen zur Entstehung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen werden also speziell solche Gene untersucht, die bei dieser eine Rolle spielen könnten. Aufgrund der maßgeblichen Beteiligung des Immunsystems bei der Krankheitsentstehung wurden beispielsweise Gene untersucht, deren Produkte bei der Regulation des Immunsystems eine Rolle spielen, für die Integrität der Lamina mucosa von Bedeutung sind oder in Zell-Zell-Interaktionen involviert sind.

Dabei werden die Häufigkeiten des Vorkommens von verschiedenen Allelen dieser Gene bei Patienten mit einer CED bestimmt und mit den Häufigkeiten der entsprechenden Allele in einer gut durchmischten Kontrollpopulation verglichen. Signifikante Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens von bestimmten Allelen dieser Gene in diesen beiden Vergleichsgruppen lassen eine sehr wahrscheinliche Beteiligung solcher Gene an der Entstehung der CED vermuten. Bei den CED wurden viele solche Kandidaten-Gene betrachtet, dabei insbesondere Gene des HLA-Systems sowie Gene, deren Proteinprodukte an der Zytokin- oder Muzinproduktion beteiligt sind oder für die Barrierefunktion der Epithelzellen des Intestinaltraktes eine Rolle spielen (Russel et al. 2004).

1.3.1.2. Screening des gesamten Genoms

Durch genomweite Scans wird das gesamte Genom des Menschen systematisch auf Auffälligkeiten der DNA-Basensequenz hin untersucht wie zum Beispiel auf sich wiederholende Basensequenzen (beispielsweise ATT ATT ATT oder GGG GGG GGG) (Russel et al. 2004).

Durch Ermittlung einer möglichen Kosegregation zwischen der Erkrankung und einer oder mehrerer dieser zahlreichen polymorphen Auffälligkeiten der DNA (sogenannter DNA-Marker), die in Abständen über das gesamte Genom verteilt vorkommen, kann ein bestimmter Genort innerhalb eines Chromosoms ausfindig gemacht werden, und damit auch Gene, die in der Entstehung der CED eine Rolle spielen könnten (Shanahan 2002).

Im Gegensatz zur Kandidaten-Gen-Analyse wird bei dieser Methode im Voraus keine Hypothese zur Pathophysiologie der CED benötigt, um Pathomechanismen der Krankheitsentstehung zu identifizieren, da einfach nur überprüft wird, ob sich zufällig diese auffälligen DNA-Abschnitte mit den CED assoziieren lassen (Shanahan 2002).

Allerdings ist es ein beschwerlicher Weg von der initialen Beobachtung einer Assoziation der Erkrankung mit auffälligen DNA-Abschnitten (sogenannten DNA-Loci) über die Replikation dieser Ergebnisse bis hin zur Identifizierung eines Gens innerhalb dieses Locus, welches für die Krankheitsentstehung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen von Bedeutung ist (Russel et al. 2004).

Der Erfolg dieser Methode ist aber am augenscheinlichsten. Durch insgesamt mehr als 10 voneinander unabhängige genomweite Scans des menschlichen Genoms und durch zahlreiche DNA-Locus-spezifische Replikationsstudien wurden mittlerweile insgesamt mindestens neun solcher auffälligen DNA-Loci beschrieben (sogenannte "inflammatory bowel disease" (IBD)-Suszeptibilitäts-Loci, nummeriert von IBD1 – IBD9; siehe Tabelle 1.3.1.2.1), die mit einer erhöhten Prädisposition für eine CED assoziiert sind (Newman et al. 2005b, Vermeire 2005).

IBD-Locus	Lage im Chromosom	Suszepti-bilitätsgene	assoziierte Erkrankung	Literatur
IBD1	16q12	*CARD15*	Morbus Crohn	(Hugot et al.1996, Cho et al. 1998, Curran et al. 1998, Hampe et al. 1999a, IBD International Consortium. 2001, Williams et al. 2002)
IBD2	12q14	unbekannt	Colitis ulcerosa	(Satsangi et al. 1996b, Curran et al. 1998, Duerr et al. 1998, Hampe et al. 1999a, Ma et al. 1999, Parkes et al. 2000)
IBD3	6p	unbekannt	CED	(Barmada et al. 2004, Hampe et al. 1999a, Hampe et al. 1999b, Rioux et al. 2000, Williams et al. 2002)
IBD4	14q11-q12	unbekannt	Morbus Crohn	(Duerr et al. 1998, Ma et al. 1999, Duerr et al. 2000, Vermeire et al. 2004b, Pierik et al. 2005)
IBD5	5q31-33	*SLC22A4/A5*	Morbus Crohn	(Cho et al. 1998, Ma et al. 1999, Rioux et al. 2000)
IBD6	19p13	unbekannt	CED	(Rioux et al. 2000, van Heel et al. 2003)
IBD7	1p36	unbekannt	CED	(Cho et al. 1998)
IBD8	16q13	unbekannt	Morbus Crohn	(Satsangi et al. 1996b)
IBD9	3p26	unbekannt	CED	(Satsangi et al. 1996b, van Heel et al. 2003, Hampe et al. 2001a, Duerr et al. 2002)

Tabelle 1.3.1.2.1: Lokalisation der neun Hauptloci, die mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert werden konnten

1.4. Identifizierung des IBD1-Locus und des *CARD15*–Gens bzw. des NOD2–Proteins

1.4.1. Der IBD1-Locus

Der erste IBD-Locus, der mittels der Screeningmethode ermittelt wurde und mit der Erkrankung des Morbus Crohn assoziiert werden konnte, wurde 1996 von einer französischen Arbeitsgruppe um Jean-Pierre Hugot, einem pädiatrisch tätigen Gastroenterologen aus Paris, in der perizentrischen Region von Chromosom 16 beschrieben und als IBD1 bezeichnet (Hugot et al. 1996). Mehrere darauffolgende

Studien konnten die Assoziation zwischen einer erhöhten Prädisposition für einen Morbus Crohn und dem IBD1-Locus bestätigen (Ohmen et al. 1996, Curran et al. 1998, Cavanaugh et al. 1998, Cho et al. 1998, Annese et al. 1999).

1.4.2. Das *CARD15*–Gen

In den Jahren zwischen 1996 und 2001 wurde von vielen Forschern versucht, den Bereich der perizentrischen Region auf dem Chromosom 16 mit einer Assoziation zum Morbus Crohn genauer zu definieren und das Gen und entsprechende Allele dieses Gens zu identifizieren, welche dieser Assoziation zugrunde liegen könnten (Ohmen et al. 1996, Curran et al. 1998, Cavanaugh et al. 1998, Cho et al. 1998, Annese et al. 1999).

Erst im Jahre 2001 konnten zwei voneinander unabhängig tätige Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Methoden in dieser Region ein Gen identifizieren, dessen Mutationen mit einem Morbus Crohn assoziiert waren (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001b). Das Gen wurde anfangs als "nucleotid-binding oligomerization domain" (NOD) 2–Gen bezeichnet und später in "caspase activating recruitment domain" (CARD) 15 umbenannt. Es besteht aus 11 konstanten Exons und aus einem alternativen 12. Exon in der 5´- Region (Ogura et al. 2001b; siehe Abbildung 1.4.2.1).

Die französische Arbeitsgruppe unter Jean-Pierre Hugot wendete die klassische Methode des "positional cloning" an, um den Koppelungsbereich in der perizentrischen Region von Chromosom 16 näher zu definieren (Russel et al. 2004). Dadurch war es möglich, eine strukturelle Karte dieser Region zu erstellen und auffällige DNA-Veränderungen, also DNA-Marker, zu kartieren. Letztendlich führten dann genauere Untersuchungen dieser auffälligen DNA-Marker unter Verwendung von künstlich veränderten Chromosomen bakteriellen Ursprungs mit nachfolgender Ermittlung der DNA-Sequenz zur Identifizierung des *NOD2*/*CARD15*–Gens (Russel et al. 2004). Anschließend wurde dieses Gen in 50 Patienten mit Morbus Crohn sequenziert und insgesamt 33 Varianten bei MC-Patienten identifiziert (Hugot et al. 2001). Durch die nachfolgende Genotypisierung von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa und einer Kontrollgruppe konnten drei Veränderungen dieses

Gens, eine Insertionsmutation (c.3020insC [p.Leu1007fsX1008]) und zwei Nukleotidaustausche (c.2104C>T [p.R702W] und c.2722G>C [p.G908R]), mit dem Morbus Crohn assoziiert werden (Hugot et al. 2001).

Die zweite Arbeitsgruppe aus den USA wendete die Kandidaten-Gen-Analyse an (Ogura et al. 2001b). Ogura und Kollegen suchten nach Kandidatengenen, die für zum NOD1-Protein homologe Proteine kodieren (Ogura et al. 2001a, Ogura et al. 2001b). NOD1 hat eine strukturelle Ähnlichkeit mit den Apoptoseregulatoren Apaf-1 ("apoptotic protease-activating factor 1") und CED-4, der für die Induktion der Apoptose bei Würmern verantwortlich ist, sowie mit sogenannten pflanzlichen R-Proteinen, die den Pflanzen eine Resistenz gegen Pathogene verleihen (Inohara et al. 1999). Da NOD1 nicht nur die Apoptose einleiten kann, sondern auch in Anwesenheit von Lipopolysacchariden verschiedener Bakterien *in vitro* zu einer verstärkten Aktivierung von NF-κB führte, wurde ihm eine mögliche Bedeutung in der Pathogenese der CED zugesprochen, und es wurde nach weiteren Proteinen gesucht, die dem NOD1 in Aufbau und Funktion ähneln (Ogura et al. 2001a, Ogura et al. 2001b). Ogura et al. stießen bei dieser Suche auf ein Eiweiß, dessen Struktur im Bereich der NOD-Region signifikant mit der des NOD1 übereinstimmte und das zu 34 % der Aminosäuresequenz des NOD1 entsprach. Die zugehörige DNA-Sequenz, die für dieses Protein kodierte, konnte man im Bereich des langen Armes von Chromosom 16 ausfindig machen (16q12, Abbildung 1.4.2.1). Diese Region überlappte mit dem IBD1-Locus (Ogura et al. 2001b, Hugot et al. 1996). Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu NOD1 wurde dieses Protein als NOD2 bezeichnet (Ogura et al. 2001a, Ogura et al. 2001b). Aufgrund der Lokalisation des für NOD2 kodierenden Gens im Bereich des IBD1-Locus und der Rolle, die die NOD-Proteine bei der Erkennung von bakteriellen Komponenten spielen (Inohara N et al. 2002), wurde von Ogura et al. die Hypothese aufgestellt, dass dieses als mögliches Suszeptibilitätsgen beim Morbus Crohn fungieren könnte. Durch eine anschließende Sequenzierung des Gens in 12 Patienten mit Morbus Crohn konnte eine Insertionsmutation (c.3020insC [p.Leu1007fsX1008]) identifiziert werden, die durch die weitere Genotypisierung von MC-Patienten und einer Kontrollgruppe mit dem Morbus Crohn assoziiert werden konnte (Ogura et al. 2001b). Da sich in dieser Studie aber zeigte, dass die Insertionsmutation nicht alleine für die Assoziation zwischen dem IBD1-Locus und der Erkrankung verantwortlich gemacht werden kann,

wurde von Ogura et al. vermutet, dass weitere strukturelle Alterationen wie zum Beispiel die Aminosäureaustausche c.2104C>T [p.R702W] und c.2722G>C [p.G908R] (Ogura et al. 2001b) ebenfalls eine Rolle spielen müssen. Diese drei Mutationen repräsentieren über 80 % der mutierten Allele (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001b, Lesage et al. 2002).

Wenn ein Allel eines Patienten durch eine dieser drei Mutationen verändert ist, so ist im Vergleich zur Normalbevölkerung das relative Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken, ungefähr dreimal so hoch. Im Falle einer Veränderung beider *CARD15*-Allele durch eine dieser Mutationen ist das Erkrankungsrisiko sogar um das 30 bis 40fache höher (Hampe et al. 2001b, Lesage et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Ahmad et al. 2002, Vermeire et al. 2002b, Bonen et al. 2003b, Akolkar et al. 2001, Cavanaugh et al. 2003, Newman et al. 2004, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001b). Allerdings weisen 60 – 70 % der MC-Patienten keine dieser *CARD15*–Genveränderungen auf (Abreu et al. 2002b, Ahmad et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Hampe et al. 2002, Lesage et al. 2002, Vermeire et al. 2002b). Durch den Ausschluss von Familien, die Träger mindestens einer dieser drei Hauptmutationen waren, konnte in Studien zudem gezeigt werden, dass diese drei Gendefekte nicht alleine für die Assoziation zwischen der Erkrankung und dem IBD1-Locus verantwortlich gemacht werden können (Hampe et al. 2002, Hugot et al. 2002).

In einer weiteren französischen Studie wurde die gesamte kodierende Region des *CARD15*-Gens bei 612 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen aus Europa sequenziert (Lesage et al. 2002). Insgesamt wurden dabei zusätzlich zu den drei häufigen *CARD15*-Mutationen 43 neue Varianten identifiziert, die einen möglichen Einfluss auf die Struktur und die Funktion des NOD2-Proteins haben könnten. Fünfundzwanzig dieser Veränderungen wurden dabei im Bereich des Exons 4 gefunden (Lesage et al. 2002).

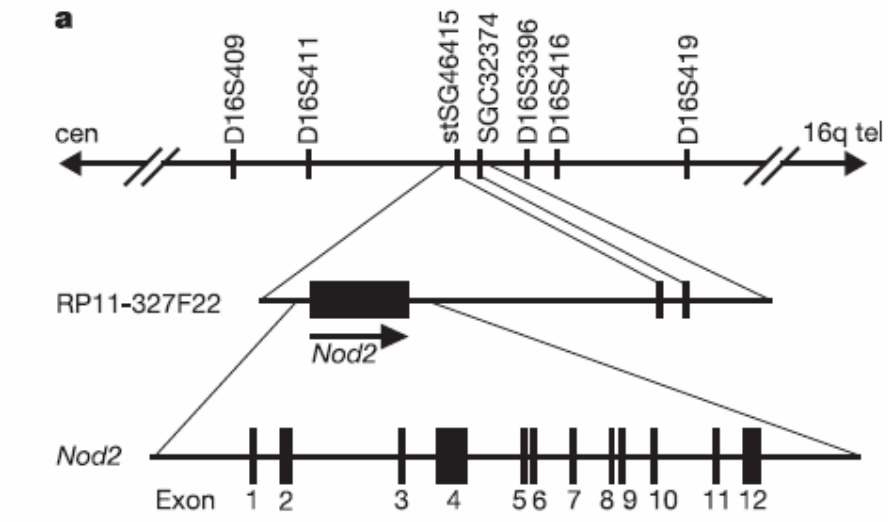


Abbildung 1.4.2.1: Dargestellt ist die perizentrische Region des Chromosoms 16 (16q12) mit den DNA-Markern und das *CARD15*-Gen mit seinen 12 Exons. In der Mitte ist der humane genomische BAC ("bacterial artificial chromosome")-Klon RP1-327F22 mit dem *CARD15*-Gen dargestellt (in Anlehnung an Ogura et al. 2001b).

1.4.3. Das NOD2-Protein

Das vom *CARD15*–Gen kodierte NOD2–Protein besteht aus zwei N-terminalen "caspase recruitment domains" (CARDs), einer zentral lokalisierten "nucleotide-binding oligomerization domain" (NOD) und zehn sogenannten "leucine-rich repeats" (LRRs) am COOH-Terminus, die aus je 27 Aminosäuren bestehen (Hugot et al. 2001, Inohara et al. 2002; siehe Abbildung 1.4.2.2).

Synthetisiert wird das NOD2–Protein in Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und in Epithelzellen des Intestinaltraktes einschließlich der Paneth-Zellen (Ogura et al. 2001a, Ogura et al. 2003, Girardin et al. 2003a, Inohara et al. 2001, Inohara et al. 2002, Gutierrez et al. 2002, Berrebri et al. 2003, Rosenstiel et al. 2003, Hisamatsu et al. 2003).

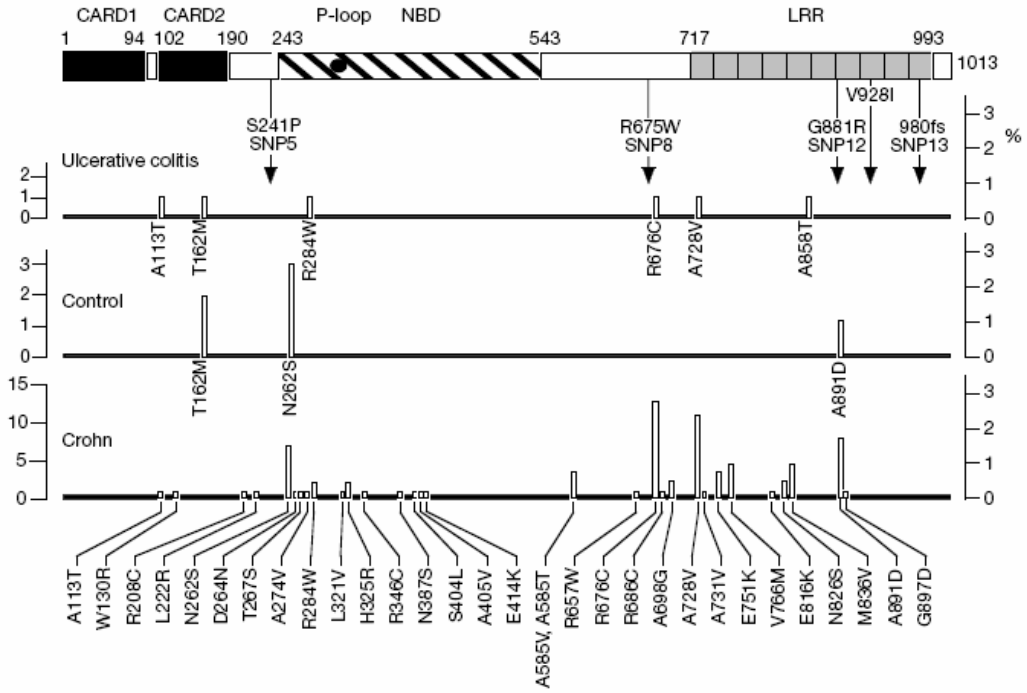


Abbildung 1.4.2.2: Darstellung des NOD2–Proteins und der Veränderungen im *CARD15*-Gen, die in der Studie von Hugot et al. im Jahre 2001 bei 457 Patienten mit Morbus Crohn, 159 Patienten mit Colitis ulcerosa und 103 gesunden und nicht mit CED-Patienten verwandten Kontrollpersonen entdeckt wurden (in Anlehnung an Hugot et al. 2001).

1.5. Beeinflussung des Phänotyps und des Krankheitsverlaufs des Morbus Crohn durch *CARD15*–Mutationen

Mehrere Studien konnten eine Assoziation zwischen den drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens (p.R702W, p.G908R und p.1007fs) und dem Morbus Crohn bestätigen. Zudem konnte in diesen Studien eine Assoziation dieser Mutationen mit einem bestimmten klinischen Erscheinungsbild und einem progredienten Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden (Hampe et al. 2001b, Lesage et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Ahmad et al. 2002, Vermeire et al. 2002b, Bonen et al. 2003b, Akolkar et al. 2001, Cavanaugh et al. 2003, Newman et al. 2004).

In verschiedenen Bevölkerungsgruppen zeigten Träger dieser *CARD15*–Mutationen gehäuft einen Befall des terminalen Ileums, einen Krankheitsausbruch schon in jungen Jahren und einen

fibrosierenden und stenosierenden Phänotyp der Erkrankung (Cuthbert et al. 2002, Ahmad et al. 2002, Akolkar et al. 2001, Newman et al. 2004, Abreu et al. 2002b, Economou et al. 2004).

Über die Auswirkungen der *CARD15*-Mutationen auf die Aggressivität bzw. den normalen Krankheitsverlauf des Morbus Crohn oder auf das Ansprechen auf eine spezifische therapeutische Substanz ist dagegen bis jetzt nur wenig bekannt, da nur sehr limitierte Daten existieren (Vermeire et al. 2002c, Mascheretti et al. 2002a, Mascheretti et al. 2002b).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die Identifikation von *CARD15* als Suszeptibilitätsgen für einen Morbus Crohn und eine Assoziation von Veränderungen in diesem Gen mit einem bestimmten Phänotyp der Erkrankung bietet neue Möglichkeiten in der Klassifizierung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, und es erlaubt möglicherweise die frühzeitige Identifizierung von Hochrisikopatienten sowie die Umsetzung einer optimierten Therapie.

Ziel der beiden hier vorgestellten Studien war es, die genetischen Analysen für den Kliniker nutzbar zu machen und die Bedeutung der Genotypisierung in der klinischen Diagnostik und Therapieplanung genauer zu definieren. Ein weiteres Hauptinteresse war die Identifizierung von genetisch determinierten Subpopulationen von CED-Patienten, die ein homogenes Krankheitsbild aufweisen. Da sich in verschiedenen Studien zeigte, dass gerade homozygote und zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger von *CARD15*-Mutationen unter einer besonders schweren CED leiden, sollte eine effektive und auch in der täglichen Routine leicht anwendbare Detektionsstrategie entwickelt werden, um solche Patienten einfach identifizieren zu können.

2. Methoden

Bei 498 nichtverwandten Patienten kaukasischer Abstammung mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (CED) wurde das *CARD15*-Gen auf mögliche Veränderungen hin untersucht. Daraus resultierten zwei mittlerweile publizierte Studien.

2.1. Studie I

"Homozygosity for the *CARD15* frameshift mutation 1007fs predicts early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis"

(Ermittlung des *CARD15*-Genotyps und des assoziierten Phänotyps bei 445 Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung und Beschreibung einer Untergruppe von Morbus Crohn–Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf, der auf einer Homozygotie für die Insertionsmutation c.3020insC (p.Leu1007fsX1008) in Exon 11 des *CARD15*-Gens beruht)

2.1.1. Studienpopulation

In diese Studie wurden insgesamt 445 CED-Patienten (46.3 % männlich, 53.7 % weiblich) kaukasischer Abstammung eingeschlossen. Darunter waren 303 Patienten mit Morbus Crohn (engl. "Crohn's disease" (CD); 68.1 % der Patienten), 127 Patienten mit Colitis ulcerosa (engl. "ulcerative colitis" (UC); 28.5 % der Patienten,] und 15 Patienten ohne sichere Zuordnung zu diesen beiden Hauptkrankheitsbildern mit der Bezeichnung „unbestimmte, nicht sicher klassifizierbare chronisch-entzündliche Darmerkrankung“ (CED) bzw. engl. "indeterminate colitis" (IC).

Alle CED-Patienten wurden im Rahmen der medizinischen Betreuung durch Ärzte der Ambulanz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen der Medizinische Klinik II - Grosshadern der Ludwig-Maximilians-Universität München in diese Studie eingeschlossen.

2.1.2. Diagnose der CED

Die Diagnose bzw. die Klassifizierung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in eine der beiden Hauptmanifestationsformen der CED, den Morbus Crohn und die Colitis ulcerosa, erfolgte durch zwei erfahrene Internisten, basierend auf klinischen Richtlinien und Kriterien in Zusammenschau mit Befunden aus der Endoskopie, Radiologie und der Histologie bzw. Pathologie. Patienten mit einer nicht sicher klassifizierbaren CED, einer "indeterminate colitis", zeigten typische, sich überlappende Charakteristika beider Erkrankungsbilder.

2.1.3. Ermittlung der klinischen Daten bzw. des Phänotpys der Patienten

Das klinische Erscheinungsbild des Morbus Crohn wurde anhand der „Wiener Klassifikation des Morbus Crohn“, die im Rahmen des "World congress of gastroenterology" 1998 in Wien aufgestellt worden ist, eingeteilt (Gasche C et al 2000). Demographische und klinische Daten des Patienten einschließlich der Erkrankungslokalisation und dem Verlauf der Erkrankung, radiologische und endoskopische Befunde, erkrankungsbedingte Komplikationen und immunsuppressive Therapie (Einnahme von Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat oder Infliximab) wurden entweder retrospektiv aus den Patientenakten durch zwei unabhängige Untersucher ermittelt oder/und zusätzlich durch einen detaillierten Fragebogen und eine Befragung des Patienten zum Zeitpunkt der Datengewinnung erhoben bzw. komplettiert.

Der Fragebogen beinhaltete folgende Parameter: Geburtsdatum, Geschlecht, Familienanamnese, Alter bei Erstdiagnose, Rauchgewohnheiten (Raucher/Ex-Raucher/Nicht-Raucher), Einnahme von Medikamenten, Voroperationen aufgrund der chronisch-entzündlichen

Darmerkrankungen, Lokalisation bzw. involvierte Abschnitte des Gastrointestinaltraktes, Komplikationen *in situ* wie z. B. Bildung von Stenosen, Fisteln und Abszessen, extraintestinale Komplikationen bzw. Manifestationen der CED sowie Angaben zum therapeutischen Management der CED inklusive der Notwendigkeit einer operativen Versorgung und der medikamentösen Therapie.

Die Diagnose von externen Fisteln (perianale, entero-kutane Fisteln) und/oder internen Fisteln (entero-enterale Fisteln, entero-vaginale Fisteln oder entero-vesikale Fisteln) basierte auf endoskopischen und radiologischen Befunden sowie Beobachtungen im Rahmen der operativen Versorgung. Gleiche diagnostische Modalitäten wurden ebenfalls zur Diagnosesicherung von Komplikationen *in situ* wie z. B. Stenosen oder Abszessen eingesetzt. Die Bezeichnung „Erkrankungsbeginn in jungen Jahren“ ("onset at an early age") wurde definiert als ein Alter bei Erstdiagnose von unter 26 Jahren. Die demographischen Hauptcharakteristika der Studienpopulation werden in Tabelle 2.1.3.1 vorgestellt.

Die Erhebeung der phänotypischen Daten erfolgte ohne Kenntnis des *CARD15*–Mutationsstatus des jeweiligen Patienten.

Vor Einschluss des Patienten/der Patientin in diese Studie wurden die Patienten durch den betreuenden Arzt/die betreuende Ärztin über die Studie aufgeklärt, und erst nach schriftlicher Einverständniserklärung durch den Patienten/die Patientin wurden die genetischen Untersuchungen durchgeführt. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt.

		CED-Patientenkohorte **(n = 445)**	
Diagnose			
MC	n = (%)	303	(68.1 %)
CU	n = (%)	127	(28.5 %)
IC	n = (%)	15	(3.4 %)
Geschlecht			
männlich	n = (%)	206	(46.3 %)
weiblich	n = (%)	239	(53.7 %)

Alter (Jahre)	
Mittelwert ± Standardabweichung	39.5 ± 13.4
Spannweite	6 - 83
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	
Mittelwert ± Standardabweichung	29.5 ± 13.2
Spannweite	6 - 81
Krankheitsdauer (Jahre)	
Mittelwert ± Standardabweichung	10.0 ± 8.1
Spannweite	0 - 42
"**body mass index**"	
Mittelwert ± Standardabweichung	23.1 ± 4.0
Spannweite	16 - 40

Tabelle 2.1.3.1: Demographische Charakteristika der Patientenkohorte (MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, IC = indeterminierte Colitis)

2.1.4. Ermittlung des *CARD15*-Genotyps

Zur Detektion der drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens (c.2104C>T (p.R702W), c.2722G>C (p.G908R) und c.3020insC (p.Leu1007fsX1008)) wurden die 3´-Region von Exon 4, die für die Aminosäuren 680-821 kodiert, sowie das Exon 8 (p.G908R-Mutation) und das Exon 11 (Insertionsmutation p.1007fs) amplifiziert und sequenziert. Die Amplifikation erfolgte nach einem Standard-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl), der aus folgenden Komponenten besteht: 1x Reaktionspuffer (ABgene, Epsom, Surrey, Großbritannien), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,125 µM dNTP-Mix (Mischung der vier Desoxynukleotide), 400 nM jedes der beiden Primer, 200 ng genomische DNA und 1,25 U einer Thermo-Start-Taq-DNA-Polymerase (ABgene).

Gestartet wurde die PCR–Reaktion mit einem initialen Denaturierungsschritt von 15 Minuten Dauer bei 95 °C zur Aktivierung der Taq-Polymerase, gefolgt von 40 Zyklen mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 20 Sekunden, einer Primer-Anlagerung bei 62 °C für 20 Sekunden und einer Elongationsphase bei 72 °C für 30 Sekunden (beziehungsweise 1 Minute im Falle des Exons

4) pro Zyklus und einer abschließenden DNA-Synthese bei 72°C für 10 Minuten. Die Menge an entstandenem PCR-Produkt wurde anschließend mittels einer Agarosegel-Elektrophorese bestimmt. Die gewonnenen DNA–Fragmente wurden dann mittels des "Qiaquick PCR purification kit" von Qiagen (Hilden, Deutschland) aufgereinigt und mit dem "ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) sequenziert. Die DNA-Sequenz wurde anschließend mit Hilfe eines ABI PRISM 377 DNA-Sequenzers (Applied Biosystems) unter Verwendung des Sequenz-Analyseprogrammes "Sequence Analysis program" Version 3.4.5 (Applied Biosystems) ermittelt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden in Abschnitt 2.3. des Methodenteils genauer beschrieben.

Tabelle 2.1.4.1 zeigt die Primer der PCR-Reaktionen und Tabelle 2.1.4.2 die Primer der Sequenzreaktionen:

Tabelle 2.1.4.1: PCR-Primer zur Amplifikation der Exons 4, 8 und 11

Exon	Primer		Größe des Produktes (bp)
	vorwärts	rückwärts	
4	5′- TTAGGTCCCGTCTTCACCATG -3′	5′- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG -3′	1936
8	5′- GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG -3′	5′- CTCCTCCCTCTTCACCTGATCTC -3′	223
11	5′- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG –3′	5′- GATCCTCAAAATTCTGCCATTCC -3′	293

Tabelle 2.1.4.2: Primer zur Sequenzierung der Exons 4, 8 und 11

Exon	Primer	Orientierung
4	5′- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG -3′	rückwärts
8	5′- GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG -3′	vorwärts
11	5′- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG –3′	vorwärts

2.1.5. Statistische Auswertung

Ein Signifikanzniveau von p = 0,05 wurde als statistisch signifikantes Ergebnis gewertet. Wenn möglich, wurde zum Vergleich qualitativer Merkmale der Chi-Quadrat-(χ^2-)Test (näherungsweise) oder der Fisher-Test (exakt) eingesetzt. Ein Vergleich von quantitativen, unverbundenen Merkmalen wurde mit dem parameterlosen Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten mit der Statistik-Software SPSS Version 13.0 (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA).

2.2. Studie II

"Eight novel *CARD15* variants detected by DNA sequence analysis of the *CARD15* gene in 111 patients with inflammatory bowel disease"

(Sequenzanalyse des *CARD15*–Gens bei 111 Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung und Erstbeschreibung von acht neuen Varianten des *CARD15*–Gens)

2.2.1. Studienpopulation

In diese Studie wurden insgesamt 111 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eingeschlossen, darunter 89 Patienten mit Morbus Crohn, 19 Patienten mit Colitis ulcerosa und drei Patienten mit „indeterminierter Colitis". Alle Patienten waren entweder heterozygote Merkmalsträger einer der drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens (c.2104C>T (p.R702W), c.2722G>C (p.G908R), bzw. c.3020insC (p.Leu1007fsX1008)), einer Veränderung im Bereich der Grenze zwischen Exon 4 und Intron 4, der c.2462+10A>C Variante, oder einer neuen Aminosäuresubstitution, die von der 3´-Region des Exon 4 kodiert wurde.

Die Diagnose des Morbus Crohn bzw. der Colitis ulcerosa erfolgte nach klinischen Richtlinien und Kriterien, basierend auf endoskopischen, radiologischen und histopathologischen Befunden. Im Falle der „indeterminierten Colitis" zeigten sich überlappende Charakteristika zwischen dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa, wodurch eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Hauptformen der CED nicht möglich war. Das gemittelte Alter bei Erstdiagnose lag bei Patienten mit Morbus Crohn bei 29.2 ± 13.6 Jahren, bei Patienten mit Colitis ulcerosa bei 31.8 ± 13.1 Jahren und im Falle der Patienten mit „indeterminierter Colitis" bei 26 ± 8.7 Jahren. Die gemittelte Erkrankungsdauer (dokumentiertes Follow-up) betrug bei MC-Patienten 10.2 ± 9.9 Jahre, bei den CU-Patienten 7.1 ± 7.2 Jahre und bei den IC-Patienten 8.7 ± 7.8 Jahre (CD vs. UC, $p = 0.135$; CD vs. IC, $p = 0.775$; UC vs. IC, $p = 0.767$).

Demographische und allgemeine klinische Daten der Patienten einschließlich der Lokalisation und dem Verlauf der CED, Angaben über CED-assoziierte Komplikationen und eine immunsuppressive Therapie der Patienten (Einnahme von Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und Infliximab) wurden retrospektiv unter Zuhilfenahme der Krankenakten durch zwei unabhängige Untersucher ermittelt. Komplettiert wurden die Daten durch Angaben aus einem detaillierten Fragebogen, wie er auch in der ersten Studie verwendet wurde, und durch Befragungen der CED-Patienten durch die Ärzte/Ärztinnen der CED-Ambulanz des Universitätsklinikums Grosshadern.

Alle Daten wurden dabei ohne Kenntnis der Ergebnisse der Typisierung des *CARD15*–Gens ermittelt.

Genehmigt wurde diese Studie ebenfalls durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München.

Alle teilnehmenden Patienten wurden vor Durchführung der Untersuchung des *CARD15*–Gens durch die Ärzte/Ärztinnen der CED-Ambulanz aufgeklärt und stimmten der Studie durch ihr schriftliches Einverständnis zu.

2.2.2. Strategie zur Detektion von Mutationen im *CARD15*–Gen

Zuerst wurden bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen routinemäßig die Bereiche des *CARD15*–Gens durch eine DNA-Sequenzanalyse untersucht, in denen sich die drei beschriebenen Hauptmutationen befinden, also die 3´-Region des Exon 4, in der die Aminosäuresubstitution p.R702W lokalisiert ist (unter Verwendung des Primers 4.V, der die Aminosäuren 680 - 821 erfasst), das Exon 8 (p.G908R Mutation) und das Exon 11 (Insertionsmutation ("frameshift mutation") p.1007fs). Ebenfalls analysiert wurde das Vorhandensein einer weiteren, in der Literatur beschriebenen Veränderung im Intron 4 des *CARD15*–Gens. Hierbei handelt es sich um einen Nukleotidaustausch von Adenin durch Cytosin (A>C) an Position +10 in Intron 4 relativ zur Exon 4-/Intron 4-Grenze (c.2462+10A>C-Variante).

Die Sequenzanalyse des *CARD15*–Gens wurde abgeschlossen, wenn keine der drei Hauptmutationen p.R702W, p.G908R und p.1007fs, die c.2462+10A>C Variante, oder eine neue Variante gefunden wurden, sowie im Falle einer Homozytogie oder zusammengesetzten Heterozygotie für die drei Hauptmutationen. In allen anderen Fällen wurde zusätzlich zur 3´-Region des Exon 4 das restliche Exon 4 sowie die Exons 5 und 6 sequenziert.

Die Strategie, die in dieser Studie angewendet wurde, basierte auf Ergebnissen einer großen Sequenzierungsstudie des *CARD15*–Gens, die von einer französischen Arbeitsgruppe (Lesage et al. 2002) durchgeführt worden war. In dieser Studie wurden alle 12 Exons des *CARD15*–Gens sequenziert. Dabei wurden in der ersten CARD-Domäne (Aminosäuren 28-124, kodiert durch Exon 2) sowie im Exon 12 keine Mutationen entdeckt. In der zweiten CARD-Domäne (Aminosäuren 127-220, kodiert durch Exon 2 und Exon 3) wurden insgesamt vier Aminosäuresubstitutionen beschrieben und nur drei weitere in den Exons 7, 9 und Exon 10 (Lesage et al. 2002). Nur bei zwei dieser sieben beschriebenen Veränderungen des *CARD15*–Gens (c.413 G>A [p.R138Q] and c.469 T>C [p.W157R]) konnte bis jetzt gezeigt werden, dass sie die Funktion des NOD2–Proteins beeinflussen und somit eine funktionelle Relevanz haben (Chamaillard et al. 2003a).

Aus diesem Grund wurden in unserer Studie die Exons 2, 3, 7, 9, 10 und Exon 12 nicht sequenziert. Mit der in unserer Studie verwendeten limitierten Sequenzierungsmethode ist es jedoch theoretisch möglich, entweder 30,5 % (3´-Region von Exon 4 sowie Exons 8 und 11) oder 73,9 % (komplettes Exon 4, 5, 6, 8 und Exon 11) der von Lesage et al. beschriebenen Veränderungen des *CARD15*–Gens zu detektieren, womit 87,5 % beziehungsweise 96,6 % der mutierten Allele erfasst werden können (Lesage et al. 2002).

2.2.3. Isolierung der genomischen DNA, Amplifikation der DNA mittels PCR und Sequenzierung der Exons 4, 5, 6, 8 und 11

Die genomische DNA der CED-Patienten wurde aus Leukozyten des peripheren Blutes mittels des sogenannten "DNA blood mini kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und aufgereinigt. Die Amplifikation der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 des *CARD15*–Gens erfolgte, wie in Studie I, in einem

Standard-PCR-Ansatz (Gesamtvolumen 50 µl), der aus folgenden Komponenten besteht: 1x Reaktionspuffer (ABgene, Epsom, Surrey, Großbritannien), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,125 µM dNTP-Mix, 400 nM jedes Primers, 200 ng genomische DNA und 1,25 U einer Thermo-Start-Taq-DNA-Polymerase (ABgene).

Tabelle 2.2.3.1 zeigt diejenigen Primer, die für die PCR der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 eingesetzt wurden:

Exon	Primer		Produkt-größe (bp)
	vorwärts	rückwärts	
4	5′- TTAGGTCCCGTCTTCACCATG -3′	5′- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG -3′	1936
5/6	5′- CTGGCACTTCAGGGATGAATG -3′	5′- CCAGATCAGACTGACTCAGGAATG -3′	557
8	5′- GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG -3′	5′- CTCCTCCCTCTTCACCTGATCTC -3′	223
11	5′- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG –3′	5′- GATCCTCAAAATTCTGCCATTCC -3′	293

Die Menge an entstandenem PCR-Produkt wurde anschließend mittels einer Agarosegel-Elektrophorese bestimmt. Die DNA–Fragmente wurden mit Hilfe des "Qiaquick PCR purification kit" von Qiagen aufgereinigt und mit dem "ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing kit" (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornien, USA) sequenziert (Abbildung 2.2.3.2 zeigt die für die Sequenzierung der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 eingesetzten Primer). Die DNA-Sequenz wurde mittels eines ABI PRISM 377 DNA-Sequenzers (Applied Biosystems) unter Verwendung des Sequenz-Analyseprogrammes "Sequence Analysis program" Version 3.4.5 (ebenfalls Applied Biosystems) ermittelt. Anschließend wurden die Sequenzen der CED-Patienten mit der Kontrollsequenz verglichen und alle Differenzen zu dieser Sequenz genauestens dokumentiert.

Die Nummerierung der Nukleotide des *CARD15*–Gens erfolgte nach der größten, von Ogura et al. im Jahre 2001 veröffentlichten *CARD15*–Gensequenz (GenBank accession number AF178930). Dabei trägt die erste Base des ATG-Startkodons die Nummer +1 (Ogura et al. 2001b).

Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte von der DNA-Isolierung bis zur Sequenzanalyse des *CARD15*–Gens erfolgt in Abschnitt 2.3. des Methodenteils.

Exon	Primer	Orientierung der Primer
4.I	5′- TGGTTTGGCCATGCACTG -3′	rückwärts
4.II	5′- GGCAAGACTTCCAGGAATTTCTC -3′	vorwärts
4.III	5′- ATCGAGCTGTACCTGAGGAAGC -3′	vorwärts
4.IV	5′- GGGATGGAGTGGAAGTGCTTG –3′	rückwärts
4.V	5′- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG -3′	rückwärts
5/6	5′- CCAGATCAGACTGACTCAGGAATG -3′	rückwärts
8	5′- GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG -3′	vorwärts
11	5′- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG –3′	vorwärts

Tabelle 2.2.3.2: Sequenzierungsprimer für die Exons 4, 5, 6, 8 und 11

2.2.4. Analyse der Aminosäureaustausche mittels der Berechnungen nach Dayhoff

Kommt es durch eine Mutation zu einer Änderung der Basensequenz der DNA, so wird häufig auch die resultierende Aminosäuresequenz verändert. Diese Änderung kann für das Protein unterschiedliche Konsequenzen haben. Die Eigenschaften können durch die veränderte Struktur des Proteins entweder verbessert werden, oder aber die Proteinstruktur bzw. die Proteinfunktion bleiben durch die Veränderung der Aminosäuresequenz unverändert erhalten. Im schlechtesten Fall kann die

Sequenzveränderung auf Proteinebene aber auch nachteilig für die Proteinstruktur sein. Daraus resultiert eine Einschränkung der Proteinfunktion bis hin zum völligen Funktionsverlust.

Die Berechnungen von Dayhoff (Dayhoff et al. 1979) beruhen auf der Beobachtung der Häufigkeit von Aminosäureaustauschen. Die Austauschhäufigkeiten der einzelnen Aminosäuren werden als prozentualer Anteil der insgesamt auftretenden Austausche, die für die jeweilige Aminosäure beobachtet worden sind, angegeben.

Dabei werden Aminosäureaustausche, die keine oder nur sehr geringe Auswirkungen auf die Proteinstruktur und die Proteinfunktion haben, häufiger beobachtet als solche mit schädlicher Wirkung. Die Austauschfrequenz einer Aminosäure kann somit als eine Art Indikator verwendet werden, an dem man sich orientieren kann, ob ein Aminosäureaustausch einer Mutation mit schweren Folgen für die Proteinstruktur und –funktion entspricht, oder ob nur ein harmloser Polymorphismus vorliegt, der keine oder nur eine geringe Beeinflussung der Proteinstruktur und –funktion zur Folge hat (Dayhoff et al. 1979).

Wendet man die Dayhoff-Kalkulationen auf zwei der drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens, c.2104C>T (p.R702W) und c.2722G>C (p.G908R), an, so errechnen sich Austauschraten von 2.4 % für p.R702W und 0.55 % für p.G908R. Die beiden Aminosäureaustausche p.R702W und p.G908R haben sich auch in funktionellen Tests (Chamaillard et al. 2003a) als Mutationen erwiesen, womit sich zeigen lässt, dass die Berechnungen von Dayhoff einen verlässlichen Vorhersagewert darstellen.

Da es sich bei der dritten Hautmutation des *CARD15*–Gens, c.3020insC (p.Leu1007fsX1008), um eine Insertionsmutation mit Verschiebung des Leserasters bei der Translation und vorzeitigem Auftreten eines Stoppkodons mit folgendem Kettenabbruch bei der Transkription handelt, kann man in diesem Falle die Berechnungen nach Dayhoff nicht anwenden.

2.3. Arbeitschritte im Labor

Die Laborarbeiten wurden im Institut für Klinische Chemie – Grosshadern des Klinikums der Universität München im Bereich Molekularbiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. P. Lohse durchgeführt.

2.3.1. Isolierung genomischer DNA

Entsprechend den Herstellerangaben wurde die genomische DNA direkt aus den kernhaltigen Zellen des NA_2EDTA-antikoagulierten Vollblutes mittels Ionenaustauschchromatographie unter Verwendung des "QiaAmp Blood Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert.

Die Proben werden hierzu nach Vorbehandliung mit einer Proteinase auf zentrifugierbare Chromatographiesäulen geladen. Von einer Silikamembran wird die DNA absorbiert und kann nach zweimaligem Waschen mit 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) eluiert werden. Gelagert wurde die so gewonnene DNA bei 4 °C.

2.3.2. Präzipitation der DNA mit Äthanol

Nukleinsäuren und Ribonukleinsäuren können in Gegenwart von Salzen gefällt werden. Die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren sind im wässrigen Milieu negativ geladen. An diese können sich positiv geladene Salzionen binden. Durch die Zugabe von absolutem Äthanol bzw. Isopropanol kommt es infolge eines Wasserentzugs zur Präzipitation.

Durchführung:

Mit 4 M NaCl-Lösung wurde die DNA–Lösung auf eine Endkonzentration von 200 mM eingestellt. Durch Hinzufügen des 2,5 fachen Volumens 100 %igen Alkohols wurden die Nukleinsäuren entweder 5 Minuten in flüssigem Stickstoff, 30 Minuten bei -80 °C oder bei -20 °C über Nacht gefällt. Nach

dreißigminütiger Zentrifugation bei 12.000 UpM und 4 °C wurde der Überstand abgekippt und verworfen, das DNA-Präzipitat in der Vakuumzentrifuge (Speed Vac) getrocknet und in einem adäquaten Volumen TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris Cl (pH 7.5)
1 mM EDTA (pH 8.0)

2.3.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase chain reaction)

Der Ursprung dieser Technik geht auf das Jahr 1983 zurück, in welchem Kary Banks Mullis das Prinzip einer *in vitro*-Vervielfältigung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) erdachte (Mullis et al. 1987). Für diese Technik, mit der es nun möglich war, spezifische Abschnitte der DNA *in vitro* zu kopieren und exponentiell zu vervielfältigen, erhielt er 1993 den Nobel-Preis. Die neue Technik wurde als "polymerase chain reaction" (PCR) bezeichnet.

Die PCR läuft in drei verschiedenen, sich wiederholenden Schritten ab:

I. Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA):

Zur Synthese eines neuen, komplementären Stranges benötigt die verwendete DNA-Polymerase einzelsträngige DNA als Matrize. Zur Spaltung der dsDNA wird diese im ersten Schritt der PCR kurz auf 95 °C erhitzt, wobei sich die dsDNA in zwei komplementäre Einzelstränge aufspaltet, an welche sich in einem weiteren Schritt die Primer (auch Oligonukleotide oder Oligos genannt) anlagern können und somit ein kurzes Stück Doppelstrang-DNA bilden, den für die DNA-Polymerase benötigten Startpunkt.

II. Annealing - Anlagerung der Primer an die Einzelstrang-DNA:

In einem zweiten Schritt werden die Proben heruntergekühlt, wobei sich die spezifischen Oligonukleotidmoleküle bei Temperaturen zwischen 55-65 °C am 5´- bzw. am 3´-Ende des zu amplifizierenden Bereiches der Einzelstrang-DNA anlagern. Damit beide DNA-Stränge als Matrize dienen können, setzt man sogenannte Vorwärts ("sense")- und Rückwärts ("antisense")-Primer hinzu, die den zu synthetisierenden Bereich der DNA begrenzen. Jedes Primer-Paar hat dabei eine optimale spezifische Anlagerungstemperatur, die mit der folgenden Formel für jedes Primer-Paar berechnet werden kann:

Formel für Oligonukleotide bis 15 Basen:

$T_m = 4x\ (G+C) + 2x\ (A+T)$

Formel für Oligos bis 70 Basen:

$T_m = 81{,}5 + 16{,}6\ (\log_{10}[J^+]) + 0{,}4\ (\%\ G+C) - (600/\text{Anzahl der Basen}) - 0{,}63\ (\%\ FA)$

Abkürzungen: A = Adenosin, C = Cytidin, FA = Formamid, G = Guanosin, J^+ = Konzentration monovalenter Kationen, T = Thymidin, T_m = berechneter Schmelzpunkt

Der T_m-Wert wird in °C angegeben und sagt aus, bei welcher Temperatur 50 % der Oligonukleotide gebunden sind. Die optimale Anlagerungstemperatur liegt dabei ca. 5 °C unter dem errechneten T_m-Wert.

III. Elongation – DNA–Synthese durch die DNA-Poymerase:

Die DNA–Polymerase lagert sich an die durch die Primer-Anlagerung entstandene doppelsträngige DNA an. Die DNA–Synthese erfolgt dann in Anwesenheit von freien Desoxyribonukleosid–Triphosphaten (dNTPs) durch die DNA–Polymerase entlang der Matrize in 5´→3´-Richtung bei 72-74 °C. Die Elongationszeit ist abhängig von der zu amplifizierenden DNA–Matrize sowie von der

Aktivität der DNA–Polymerase. In der Regel werden ca. 1000 – 2000 Basen in 60 Sekunden synthetisiert.

Die neu entstandenen DNA–Stränge beginnen zunächst jeweils mit einem Primer und reichen über die Position des Primers des gegenüberliegenden Stranges hinaus, so dass auf jedem neuen DNA–Strang auch beide Primer–Bindungsstellen vorhanden sind.

Wird dieser Dreischritt-Prozess wiederholt, werden die DNA-Doppelstränge durch eine erneute Denaturierung wieder voneinander getrennt und stehen somit in einem weiteren Zyklus als Matrize zur Verfügung. Nach n Zyklen (n = Anzahl der Zyklen) kann man somit theoretisch ein Maximum von 2^n doppelsträngigen Molekülen erhalten. Die PCR-Produkte können anschließend beispielsweise auf ihre Sequenz hin untersucht werden.

Die verwendete DNA–Polymerase muss hitzestabil sein, damit sie die sich wiederholenden Denaturierungsschritte übersteht. Meistens werden sogenannte Taq–Polymerasen aus dem thermophilen Bakterienstamm *Thermus aquaticus* eingesetzt.

2.3.3.1. Standardprotokoll für PCR-Reaktionen

Für jedes PCR-Produkt müssen die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich Spezifität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Effizienz empirisch bestimmt werden.

Um die Spezifität und die Reproduzierbarkeit zu optimieren sowie einen möglichst fehlerfreien Nukleotideinbau sicherzustellen, müssen verschiedene Protokolle für die einzelnen Primer verwendet werden. Sie unterscheiden sich in den Anlagerungstemperaturen, den Reaktionszeiten der einzelnen Zyklusschritte, der Zykluszahl (25 – 40 Zyklen) und der Zusammensetzung der Puffer. Angesetzt werden die PCR´s in 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Um während der laufenden PCR die Kondensation von Wasser im Gefäßdeckel zu verhindern, die zu einer Konzentrationsänderung des Reaktionsgemisches führen würde, werden die PCR´s im Thermocycler mit Deckelheizung durchgeführt.

Ein Standard-PCR-Ansatz enthält:

5 µl	10x Reaktionspuffer
5 µl	dNTP-Mix (Mischung der vier Desoxynukleotide in einer Endkonzentration von 0,125 mM)
1 µl	Vorwärts-Primer (400 nM)
1µl	Rückwärts-Primer (400 nM)
ca. 200 ng	genomische DNA
1,25 U	Taq-Polymerase
5-10 %	DMSO (falls erforderlich)

Aqua bidest. q. s. 50 µl

Kaliumchlorid erleichtert das Hybridisieren der Primer an die komplementäre DNA, Magnesiumchlorid wird für die Funktionsfähigkeit der Taq-Polymerase benötigt, und der Tris-HCl-Puffer hält für das Enzym das pH-Optimum von 8-9 konstant.

Zur Aktivierung der Taq-Polymerase wird initial 15 Minuten bei 95 °C denaturiert, in den sich anschließenden Zyklen jeweils 20 Sekunden. Die Primer-Anlagerung dauert 20 - 40 Sekunden, und die Elongationszeit beträgt je nach Produktlänge 30 Sekunden bis 1 Minute (im Falle des Exon 4). Am Ende schließt sich ein 10-minütiger Extensionsschritt bei 72 °C an, um eine vollständige Synthese der PCR-Produkte zu gewährleisten.

Tabelle 2.3.3.1.1 beschreibt die PCR-Bedingungen für die Exons 4, 5, 6, 8 und 11 des *CARD15*-Gens

Exon	Denaturierung	Annealing	Elongation	Zyklen
4	95 °C 20 sec	62 °C 20 sec	72 °C 1 min	40
5/6	95 °C 20 sec	62 °C 20 sec	72 °C 30 sec	40
8	95 °C 20 sec	62 °C 20 sec	72 °C 30 sec	40
11	95 °C 20 sec	62 °C 20 sec	72 ° 30 secC	40

2.3.4. Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotide sind kurze, einzelsträngige Nukleinsäuren von etwa 20 - 30 Basen Länge. In der "Annealing"-Phase hybridisieren sie bei Temperaturen zumeist zwischen 55 und 65 °C mit der komplementären Sequenz auf der DNA. Sie dienen der DNA-Polymerase als Startpunkt für die Elongation der DNA. Mit Hilfe dieser Oligonukleotid-Primer ist eine schnelle und spezifische Amplifizierung gewünschter DNA-Abschnitte mittels PCR und weiterführend eine Sequenzierung dieser DNA-Abschnitte möglich.

Beim Primerdesign sollten folgende Punkte grundsätzlich beachtet werden:

- Vermeidung von Bereichen mit ungewöhnlichen Sequenzabschnitten wie Polypurin- oder Polypyrimidin-Trakten oder sich wiederholenden Motiven;
- das Basenverhältnis G/C zu A/T sollte annähernd gleich sein;
- um eine möglichst hohe Anlagerungstemperatur zugunsten einer hohen Spezifität zu erzielen, sollte der Guanin (G)- und Cytosin (C)-Anteil gemäß der unter 2.3.3.II genannten Formel zur Berechnung der T_m bei etwa 50 – 60 % liegen;
- die Schmelztemperaturen von Vorwärts- und Rückwärts-Primer sollten etwa im gleichen Bereich liegen;
- je größer das zu amplifizierende DNA-Fragment ist, desto länger sollten die Oligonukleotide gewählt werden;
- der Einsatz längerer Oligonukleotide führt nicht zu einer Spezifitätssteigerung;
- die letzten fünf Nukleotide des 3´-Endes dürfen in der Summe nicht mehr als zwei G´s und C´s enthalten, damit ein relativ instabiles 3´-Ende entsteht und somit unspezifische Produkt-Amplifikationen vermieden werden.

2.3.4.1. Synthese der Oligonukleotide

Die Primersynthese wurde im Auftrag von der Firma Thermo Electron in Ulm im Maßstab 0,02 µMol durchgeführt.

2.3.4.2. Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2.3.4.2.1 zeigt die zur Amplifikation der verschiedenen Exons verwendeten Primer:

Exon	Primer		Größe des Produktes (bp)
	vorwärts	rückwärts	
4	5′- TTAGGTCCCGTCTTCACCATG -3′	5′- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG -3′	1936
5/6	5′- CTGGCACTTCAGGGATGAATG -3′	5′- CCAGATCAGACTGACTCAGGAATG -3′	557
8	5′- GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG -3′	5′- CTCCTCCCTCTTCACCTGATCTC -3′	223
11	5′- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG –3′	5′- GATCCTCAAAATTCTGCCATTCC -3′	293

2.3.5. Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese stellt eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten dar. Da die DNA bei Anlegen der Spannung unbeschädigt durch die Poren von Agarosegelen wandert, lässt sie sich zudem als biologisch intakte Doppelhelix re-isolieren.

Im elektrischen Feld wandert die negativ geladene DNA von der Anode zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA hängt von mehreren Faktoren ab wie z. B. der Fragmentlänge, der angelegten Spannung, der Konzentration und Schichtdicke des Agarosegels sowie der Art und Konzentration des Laufpuffers.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wird die DNA mit speziellen DNA-Farbstoffen wie z.B. Ethidiumbromid angefärbt. Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, durch den die DNA bei UV-Bestrahlung (λ = 302 nm) sichtbar wird.

Durchführung:

Im ersten Arbeitsschritt wurde die mit Marathon-Puffer versetzte Agarose durch Erhitzen in der Mikrowelle geschmolzen und in einen Gelträger gegossen. Die Agarosekonzentration wird der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst (von 0,5 bis 3 %; bei den hier entstandenen Fragmenten 1,5 %).

Dann wurden die DNA-Proben in einen Ladepuffer aufgenommen, der 15 % Ficoll enthält, um ein Aufschwimmen der Proben beim Laden zu vermeiden, und mit je 0,25 % Bromphenolblau und Xylencyanol als Farbstoffmarker versetzt ist. Die Elektrophorese wurde je nach Größe des Gels mit einer Stromstärke von 40 – 100 mA durchgeführt. Nach erfolgter Auftrennung der Fragmente wurde das Gel für ein paar Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt. Zum Entfernen überschüssigen Ethidiumbromids wurde danach noch für einige Minuten entfärbt.

Zur Detektion der DNA wurde ein UV-Transilluminator (λ = 302nm) verwendet und zur Dokumentation zudem eine Photographie des gefärbten Gels angefertigt. Zur Bestimmung der Größe der einzelnen DNA-Fragmente wurde parallel zu den Proben ein Größenmarker aufgetragen, der aus unterschiedlich großen DNA-Fragmenten mit definierter Länge besteht (in diesem Fall die sogenannte "1kb DNA ladder").

Ficoll-Ladepuffer:	15 %	Ficoll
	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylencyanol

Marathon-Puffer (10x):	1,35 M	Tris
	0,45 M	Borsäure
	25 mM	EDTA

2.3.6. Isolierung und Reinigung der PCR-Produkte

Zur Durchführung weiterer enzymatischer Reaktionen wie z. B. einer Sequenzierung, die mit den erhaltenen PCR-Produkten durchgeführt werden soll, müssen diese zuvor gereinigt werden, d.h. Primer, Salze, freie Nukleotide (dNTP´s) sowie die thermostabile Taq-Polymerase müssen entfernt werden. Zur Isolierung der DNA-Fragmente werden beispielsweise DNA-Extraktionsmethoden verwendet, die auf dem Prinzip der spezifischen Bindung der Nukleinsäuren an Glas- oder Silikaoberflächen in Anwesenheit eines chaotropen Salzes beruhen. Nach mehreren Waschschritten kann die DNA dann, frei von störenden Verunreinigungen, mit einem Niedrigsalzpuffer oder Aqua bidest. eluiert werden.

2.3.6.1. Direkte Aufreinigung der DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen

Entsteht während der Amplifikation das spezifische gewünschte PCR-Produkt, kann dies unter der Verwendung des "Qiaquick PCR Purification Kit" gereinigt werden. Aufgrund synergistischer Effekte werden nur DNA-Fragmente mit einer Mindestlänge von 100 Basenpaaren an die Silikamembran gebunden, während Primer und Primer-Dimere in Lösung bleiben.

2.3.7. DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung erfolgt nach der im Jahre 1977 von der Arbeitsgruppe Sanger et al. veröffentlichten Didesoxy-Kettenterminations-Methode (Sanger et al. 1977). Dabei wird, von einem Oligonukleotid-Primer ausgehend, durch eine DNA-Polymerase der komplementäre Strang einer Einzelstrang-DNA synthetisiert. Dem Nukleotidgemisch sind Didesoxynukleotide (sogenannte Stopnukleotide) in einem geringen Verhältnis (ca. 1:100) beigemischt. Wird nun statt eines normalen Nukleotids ein Didesoxynukleotid in den DNA-Strang eingebaut, bricht die Synthese ab, da dem Stopnukleotid die zur Kettenverlängerung notwendige 3´-OH-Gruppe fehlt. Der Einbau der Didesoxynukleotide erfolgt dabei rein zufällig, so dass eine Vielzahl von DNA-Strängen

unterschiedlicher Kettenlänge entsteht, die sich in ihrer Länge jeweils genau um eine Base unterscheiden und damit in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel voneinander getrennt werden können.

Jedes der vier Stopnukleotide ist an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein- oder Rhodaminderivate) gekoppelt (Dye-Terminatoren), die unterschiedliche Emissionsmaxima aufweisen. Am Ende der Trennstrecke werden die markierten DNA-Moleküle von einem Laser (Wellenlängenmaximum bei λ = 488 und 512 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Das emittierte Licht wird über ein Spiegelsystem durch eine CCD-Kamera über einen virtuellen Filter detektiert und kann somit spezifisch dem detektierten Stopnukleotid zugeordnet werden.

2.3.7.1. DNA-Sequenzreaktion

Die DNA-Sequenzierung wird als sogenannte Zyklus-Sequenzierung durchgeführt. Sie ähnelt dabei im Ablauf und in einzelnen Reaktionskomponenten der PCR. Als Enzym wird die AmpliTaq-Polymerase FS verwendet. Es handelt sich um eine Doppelmutante der Wildtyp-Taq-Polymerase ohne 5'→3'-Nuklease-Aktivität und mit einer verbesserten Einbaurate von Didesoxynukleotiden. Im Gegensatz zur PCR, bei der Vorwärts- und Rückwärts-Primer zugesetzt werden müssen, um einen spezifischen Abschnitt der DNA zu amplifizieren, wird bei der DNA-Sequenzierung nur ein Primer verwendet. Das Ende des zu synthetisierten DNA-Stranges wird durch den zufälligen Einbau eines Didesoxynukleotids, verbunden mit einem Kettenabbruch, bestimmt.

Reaktionskomponenten	Stoffmenge	Volumen
DNA		1-7 µl
ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready-Mix*		2 µl
Primer	3-5 pmol (Konzentration: 5 µg/ml)	1 µl
H_2O		q.s.
Gesamtvolumen:		10 µl

Tabelle 2.3.7.1.1 zeigt die Stoffmengen und Volumina der bei der Sequenzreaktion eingesetzten Reaktionskomponenten.

** Der "ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Mix" (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) enthält: dNTP´s, A-Dye-Terminator mit dichloro (R6G9), C-Dye-Terminator mit dichloro (ROX), G-Dye-Terminator mit dichloro (R110), T-Dye-Terminator mit dichloro (TAMRA) markiert, AmpliTaq-DNA-Polymerase FS, $MgCl_2$, Tris-HCl-Puffer pH 9,0*

Tabelle 2.3.7.1.2 zeigt die zur Sequenzreaktion der Exons 4, 5, 6, 8, und 11 verwendeten Primer:

Exon	Primer	Orientierung
4.I	5′- TGGTTTGGCCATGCACTG -3′	rückwärts
4.II	5′- GGCAAGACTTCCAGGAATTTCTC -3′	vorwärts
4.III	5′- ATCGAGCTGTACCTGAGGAAGC -3′	vorwärts
4.IV	5′- GGGATGGAGTGGAAGTGCTTG –3′	rückwärts
4.V	5′- CTCCCACACTTAGCCTTGATGG -3′	rückwärts
5/6	5′- CCAGATCAGACTGACTCAGGAATG -3′	rückwärts
8	5′- GGAGGAGGACTGTTAGTTCATGTCTAG -3′	vorwärts
11	5′- GACAGGTGGGCTTCAGTAGACTG –3′	vorwärts

Als DNA-Matrize wird das gereinigte PCR-Produkt eingesetzt. Alle störenden Nebenprodukte wie PCR-Primer, Äthanol, unspezifische Produkte u.ä. müssen unbedingt vorher entfernt worden sein (siehe oben).

Durchgeführt wird die Sequenzreaktion in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen:

Temperatur	Zeit	Zylen
96°C	**10 s**	
50°C	**5 s**	**25**
60°C	**2 min**	

Zur Bestätigung wurde das PCR-Fragment, in dem eine Mutation detektiert worden war, sowohl mit dem Vorwärts- als auch mit dem Rückwärts-Primer sequenziert.

2.3.7.2. Reinigung der Sequenzreaktionsprodukte

Um Störsignale bei der Elektrophorese zu vermeiden, müssen nach der Sequenzreaktion die Sequenzreaktionsprodukte von überschüssigen Dye-Terminatoren, Enzym und Salzen gereinigt werden.

Durchführung:

Die Sequenzreaktion wird mit 10 µl H_2O verdünnt. Anschließend wird die DNA mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 55 µl absolutem Äthanol gefällt. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 14000 U/min^{-1} und Raumtemperatur wird der Überstand dekantiert und verworfen. Das Pellet wird mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Proben werden anschließend in der Speed-Vac getrocknet und in 3 µl Ladepuffer resuspendiert. Kurz vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proben zwei Minuten bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt, damit sich kein Doppelstrang bilden kann. Von jeder Probe wird das halbe Volumen, also je 1,5 µl, geladen.

Ladepuffer: 25 mM EDTA, pH 8,0

50 mg/ml Dextranblau, gemischt mit Formamid im Verhältnis 1:5

2.3.7.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur DNA-Sequenzierung

Die elektrophoretische Auftrennung der bei der Sequenzreaktion entstandenen Produkte erfolgte in einem "ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer" (Applied Biosystems). Verwendet wurden 5 %ige Polyacrylamidgele mit Zusatz von 7 M Harnstoff. Der Harnstoff wirkt denaturierend und verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA, so dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA-Moleküle ausschließlich durch ihre Größe bestimmt wird.

Die Gelbestandteile werden in Aqua bidest. gelöst und durch einen 0,2 µm-Filter filtriert, um unlösliche Partikel zu entfernen. Anschließend wird die Lösung mindestens fünf Minuten entgast. Unmittelbar vor dem Gießen werden 350 µl 10 %ige Ammoniumpersulfatlösung und 20 µl TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin) zum Start der Radikalkettenreaktion zugesetzt. Das Gel wird mit einer Spritze unter Verwendung eines speziellen Aufsatzes, der auf eine Seite der Glasplatten aufgesteckt wird, zwischen zwei Glasplatten (36 cm Länge, 0,2 mm Geldicke), die in einem Rahmen fixiert sind, gegossen. Der Gießaufsatz wird anschließend entfernt. Auf der anderen Seite wird dann ein Kamm mit 36 Haifisch-Zähnen zwischen die Glasplatten gesteckt. In horizontaler Lage wird das Gel anschließend ca. eineinhalb Stunden gelagert, bis es vollständig auspolymerisiert ist.

Das auspolymerisierte Gel wird in den "ABI PRISM 377 DNA Sequencer" (Applied Biosystems) eingespannt, die Pufferkammern des Gerätes mit 1x TBE-Puffer gefüllt und zur Äquibilibrierung des Gels der Vorlauf gestartet. Während dieser Phase wird das Gel auf 50 °C erwärmt, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen der DNA zu unterbinden. Dann werden die einzelnen Proben in die Taschen zwischen den Haifisch-Zähnen geladen. Bis zu 36 Proben können auf ein Gel aufgetragen werden. Die Geschwindigkeit des Laser-Durchlaufs (die Detektionsgeschwindigkeit) beträgt bei einer angelegten Spannung von 2700 V etwa 200 Basen/h. Dies entspricht je nach Länge der zu sequenzierenden DNA einer Laufzeit zwischen vier und acht Stunden.

5 %iges Polyacrylamidgel/ 7 M Harnstoff

21	g	Harnstoff
8,4	ml	30 %ige Acrylamidlösung (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid), deionisiert (Amberlite MB Resin 1 A)
6,0	ml	10x TBE-Puffer
20,0	ml	Aqua bidest.

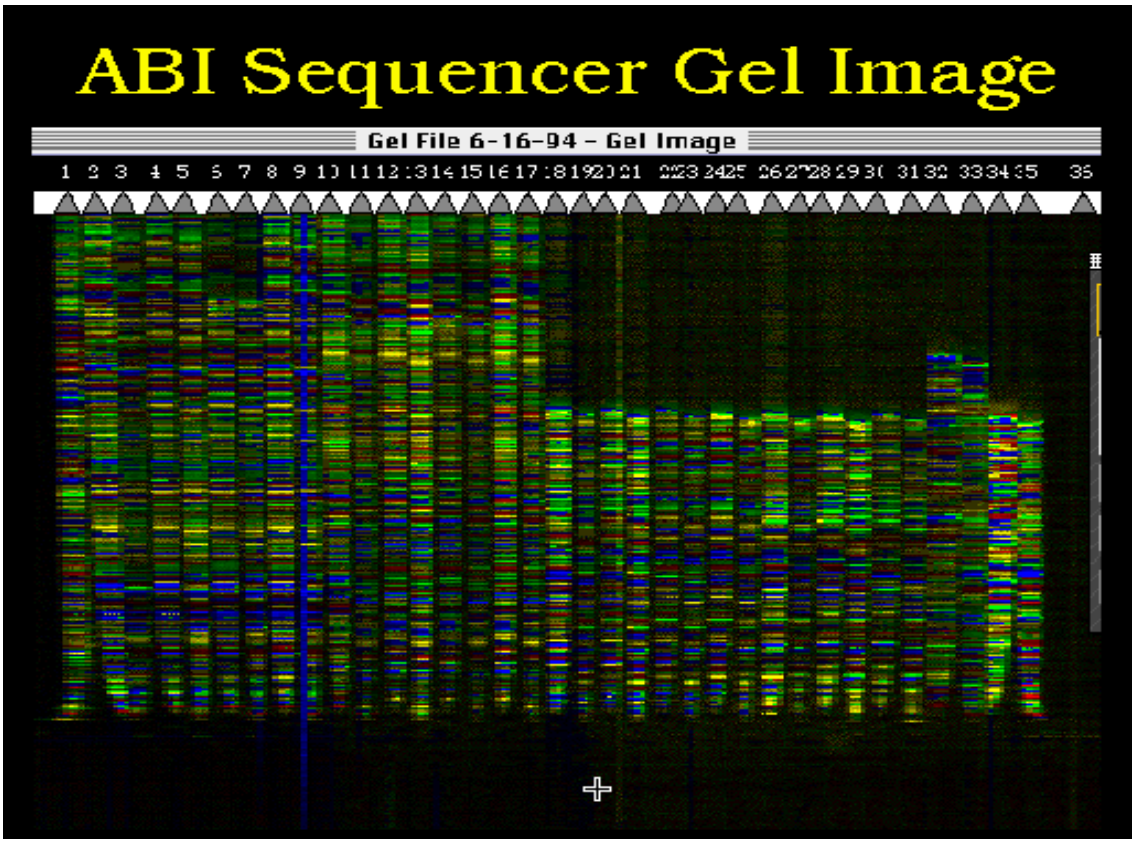
10 x TBE-Puffer

108,0	g	Tris-Base
55,0	g	Borsäure
7,4	g	Na_2EDTA
ad 1	l	Aqua bidest.

2.3.7.4. Auswertung der Sequenzgele

Während des Gellaufs erfasst eine CCD-Kamera die Fluoreszenzdaten, die dann mittels spezieller Software ("ABI PRISM™ Data Collection", Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verarbeitet werden. Aus den Rohdaten wird durch eine andere Software ("ABI PRISM™ Sequence Analysis program version 3.4.5", Applied Biosystems) ein Gelbild (Abb 2.3.7.4.1) generiert, wobei jede der 36 Spuren ("lanes") einzeln analysiert wird. Jeder der vier vorkommenden Farben wird ein Nukleotid zugeordnet. Die Farbe Grün wird durch das Nukleotid Adenin repräsentiert, Rot durch Cytosin, Gelb duch Thymin und Blau durch Guanin. Kommt es nun bei der Detektion zu Überlagerung von verschiedenen Signalen, wird durch das Computerprogramm ein „N“ gesetzt. Anschließend vergleicht man mit Hilfe des Programms "Sequence Navigator" (Applied Biosystems) oder mit dem Auge die Sequenz mit einer Normalsequenz.

Abbildung 2.3.7.4.1: Gelbild eines ABI PRISM 377-DNA Sequencers (Applied Biosystems)



3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Studie I

"Homozygosity for the *CARD15* frameshift mutation 1007fs predicts early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis"

3.1.1. Genotyp-Phänotyp-Korrelation der drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens (p.R702W und p.G908R, kodiert von Exons 4 und 8, und der Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11)

In der Studienpopulation von 445 nicht verwandten CED-Patienten kaukasischer Abstammung ließ sich bei 303 Patienten keine der drei Hauptmutationen p.R702W, p.G908R und p.Leu1007fsX1008 nachweisen („Wildtyp"/WT; 68.1 %), während 104 Patienten heterozygote Merkmalsträger waren (34.3 %). Bei 38 Patienten waren dagegen beide Allele betroffen (homozygote oder zusammengesetzt heterozygote Träger; 8.5 %). Veränderte *CARD15*-Allele wurden häufiger bei Patienten mit Morbus Crohn als bei Patienten mit Colitis ulcerosa gefunden ($p = 0.0000003$; OR 3.73; CI 2.17-6.39, Diagramm 3.1.1.1).

Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen Trägern von *CARD15*–Mutationen und Patienten mit dem Wildtyp hinsichtlich des "body mass index" (BMI), des Verhältnisses von männlichen zu weiblichen Patienten, der Familienanamnese und der Erkrankungsdauer (Tabelle 3.1.1.1) beobachtet. Interessanterweise war der Anteil von Rauchern in der Patientengruppe mit *CARD15*–Mutationen kleiner als in der ohne *CARD15*-Mutation ($p = 0.004$).

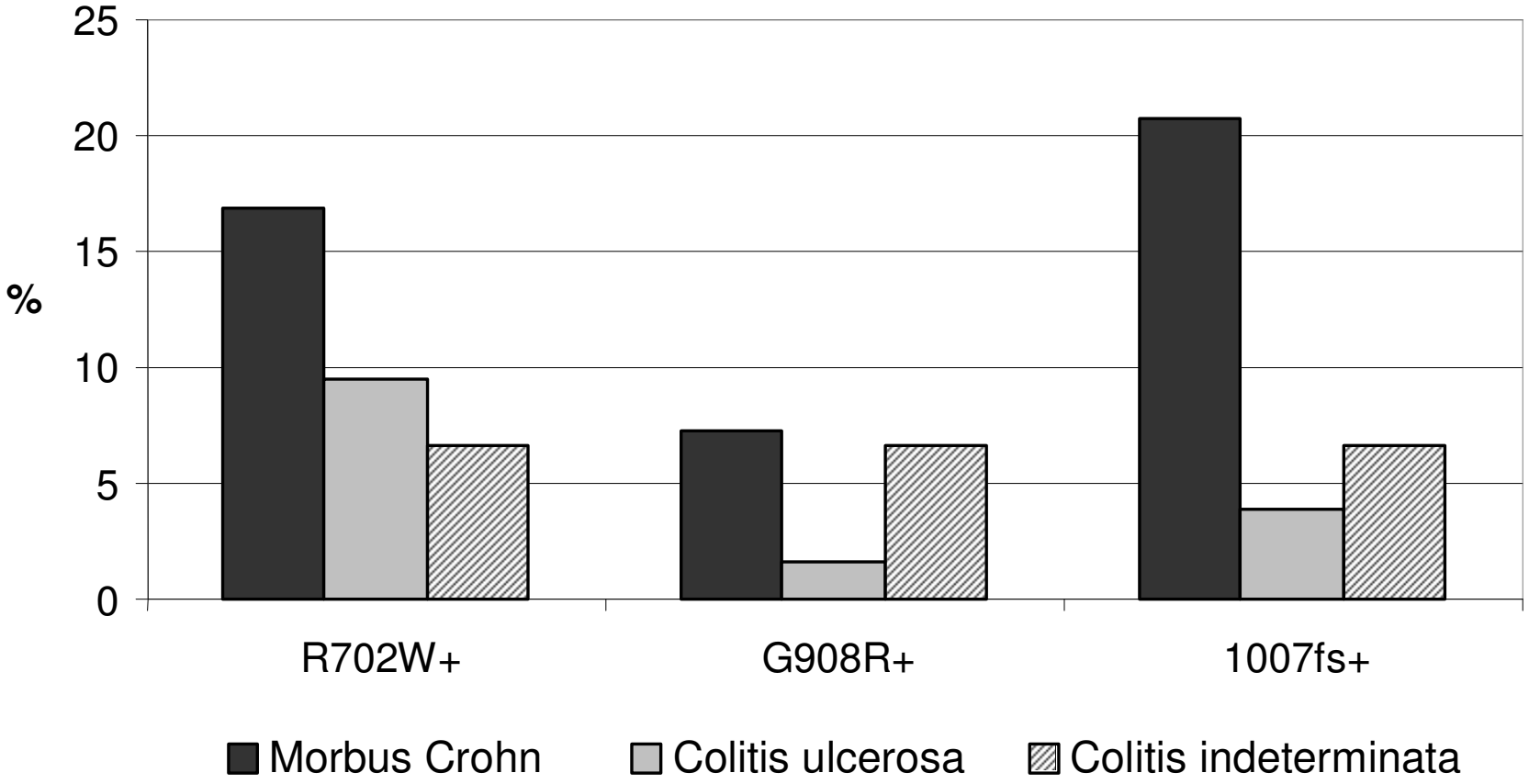


Diagramm 3.1.1.1: Verteilung der *CARD15*-Mutationen bei Patienten mit Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und indeterminierter Colitis

Tabelle 3.1.1.1: *CARD15*-Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Der Phänotyp der Patienten mit Morbus Crohn wurde anhand der „Wiener Klassifikation des Morbus Crohn“ von 1998 eingeteilt (Gasche et al. 2000): Alter: < 40 Jahre (A1), > 40 Jahre (A2); Lokalisation der Erkrankung: terminales Ileum (L1), Colon (L2), Ileocolon (L3), oberer GI-Trakt (L4); Verlauf: nicht-stenosierend, nicht-penetrierend (B1); stenosierend (B2), penetrierend (B3) (RR = relatives Risiko (engl. "odds ratio"), KI = Konfidenz-Intervall (engl. "confidence interval"), CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung).

Tabelle 3.1.1.1. Teil I	**Wildtyp**	**heterozygote Mermalsträger**	**homozygote / zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger**	***p*-Wert**	***p*-Wert**	***p*-Wert**	***p*-Wert**
	(0)	**(1)**	**(2)**	**RR (KI)**	**RR (KI)**	**RR (KI)**	**RR (KI)**
	n=183	n=84	n=36	**(0) vs. (1)**	**(0) vs. (2)**	**(1) vs. (2)**	**(0) vs. (1)+(2)**
Geschlecht (n=303)							
weiblich n = (%)	100 (54.6%)	44 (52.4%)	19 (52.8%)	*p*=0.792	*p*=0.857	*p*=1.000	*p*=0.725
männlich n = (%)	83 (45.4%)	40 (47.6%)	17 (47.2%)	0.91 (0.54-1.53)	0.93 (0.45-1.90)	1.02 (0.46-2.22)	0.92 (0.58-1.49)
Familienanamnese f. eine CED (n=262)				*p*=0.124	*p*=0.780	*p*=0.600	*p*=0.173
Positiv n = (%)	21 (11.5%)	16 (19.0%)	5 (13.9%)	1.81 (0.88-3.71)	1.19 (0.41-3.42)	0.66 (0.22-1.98)	1.61 (0.83-3.12)
"body mass index" (BMI) (n=284)							
Mittelwert ± Standardabweichung	23.3 ± 4.2	22.8 ± 3.5	22.7 ± 3.7	*p*=0.384	*p*=0.406	*p*=0.851	*p*=0.291
Spannweite	16 - 40	16 – 32	16 - 32	N/A	N/A	N/A	N/A
Alter bei Erstdiagnose (Jahre) (n=298)							
Mittelwert ± Standardabweichung	28.7 ± 12.1	29.1 ± 14.1	24.4 ± 8.8	*p*=0.819	*p*=0.016	*p*=0.029	*p*=0.497
Spannweite	11 - 71	7 – 66	9 – 50	N/A	N/A	N/A	N/A
Erkrankungsdauer der CED (Jahre) (n=298)							
Mittelwert ± Standardabweichung	10.0 ± 7.8	11.1 ± 9.9	11.3 ± 7.6	*p*=0.370	*p*=0.347	*p*=0.893	*p*=0.254
Spannweite	0 - 31	1 – 42	1 – 33	N/A	N/A	N/A	N/A

Tabelle 3.1.1.1. Teil II	**Wildtyp** (0) n=183	**heterozygote Mermalsträger** (1) n=84	**homozygote / zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger** (2) n=36	***p*-Wert RR (KI) (0) vs. (1)**	***p*-Wert RR (KI) (0) vs. (2)**	***p*-Wert RR (KI) (1) vs. (2)**	***p*-Wert RR (KI) (0) vs. (1)+(2)**
Vienna A (Alter bei Erstdiagnose) (n=298)							
<40 Jahre n = (%)	152 (83.1%)	63 (75.0%)	33 (91.7%)	*p*=0.172	*p*=0.184	*p*=0.033	*p*=0.751
>40 Jahre n = (%)	29 (15.8%)	19 (22.6%)	2 (5.6%)	0.63 (0.33-1.21)	3.15 (0.72-13.85)	4.98 (1.09-22.68)	0.87 (0.47-1.62)
Vienna L (Lokalisation) (n=298)							
L1 n = (%)	11 (6.0%)	12 (14.3%)	4 (11.1%)	*p*=0.033 2.65 (1.12-6.29)	*p*=0.274 1.99 (0.60-6.66)	*p*=0.774 0.75 (0.22-2.52)	*p*=0.038 2.40 (1.07-5.37)
L2 n = (%)	36 (19.7%)	17 (20.2%)	2 (5.6%)	*p*=0.870 1.05 (0.55-2.01)	*p*=0.051 0.24 (0.06-1.06)	*p*=0.055 0.23 (0.05-1.06)	*p*=0.447 0.76 (0.41-1.41)
L3 n = (%)	92 (50.3%)	40 (47.6%)	26 (72.2%)	*p*=0.791 0.92 (0.55-1.55)	*p*=0.005 3.11 (1.98-6.98)	*p*=0.014 3.03 (1.27-7.26)	*p*=0.479 1.20 (0.76-1.92)
L4 n = (%)	42 (22.9%)	13 (15.5%)	3 (8.3%)	*p*=0.194 0.62 (0.31-1.24)	*p*=0.067 0.31 (0.09-1.06)	*p*=0.386 0.50 (0.13-1.87)	*p*=0.038 0.51 (0.27-0.96)
Vienna B (Krankheitsverlauf) (n=299)							
B1 n = (%)	36 (19.7%)	25 (29.8%)	0	*p*=0.086 1.68 (0.94-3.07)	*p*=0.001 N/A	*p*=0.0001 N/A	*p*=0.884 1.06 (0.60-1.89)
B2 n = (%)	47 (25.7%)	18 (21.4%)	10 (27.8%)	*p*=0.447 0.77 (0.42-1.43)	*p*=0.835 1.13 (0.51-2.53)	*p*=0.478 1.47 (0.60-3.61)	*p*=0.683 0.87 (0.51-1.49)
B3 n = (%)	97 (53.0%)	41 (48.8%)	25 (69.4%)	*p*=0.509 0.82 (0.49-1.37)	*p*=0.063 2.14 (0.97-4.71)	*p*=0.027 2.62 (1.12-6.13)	*p*=0.813 1.07 (0.67-1.70)

Tabelle 3.1.1.1. Teil III	**Wildtyp**	**heterozygote Mermalsträger**	**homozygote / zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger**	***p*-Wert**	***p*-Wert**	***p*-Wert**	***p*-Wert**
	(0)	**(1)**	**(2)**	**RR (KI)**	**RR (KI)**	**RR (KI)**	**RR (KI)**
	n=183	n=84	n=36	**(0) vs. (1)**	**(0) vs. (2)**	**(1) vs. (2)**	**(0) vs. (1)+(2)**
Lokalisation im Ileocolon (n=299)				*p*=0.135	*p*=0.008	*p*=0.001	*p*=1.000
n = (%)	119 (65.0%)	47 (55.9%)	31 (86.1%)	0.66 (0.39-1.12)	4.04 (1.36-11.96)	6.10(1.98-18.83)	0.99 (0.61-1.61)
Stenose(n) (n=299)				*p*=0.272	*p*=0.002	*p*=0.0004	*p*=0.802
n = (%)	119 (65.0%)	49 (58.3%)	32 (88.9%)	0.72 (0.42-1.22)	5.47 (1.61-18.58)	7.62 (2.16-26.87)	1.09 (0.67-1.79)
Abszess(e) (n=299)				*p*=1.000	*p*=0.705	*p*=0.681	*p*=0.904
n = (%)	70 (38.3%)	33 (39.3%)	12 (33.3%)	1.02 (0.60-1.73)	0.82 (0.38-1.75)	0.81 (0.35-1.87)	0.96 (0.59-1.54)
Fistel(n) (n=299)				*p*=0.509	*p*=0.063	*p*=0.027	*p*=0.813
n = (%)	97 (53.0%)	41 (48.8%)	25 (69.4%)	0.82 (0.49-1.37)	2.14 (0.97-4.71)	2.62 (1.12-6.13)	1.07 (0.67-1.70)
Operationen aufgrund der CED (n=287)				*p*=0.278	*p*=0.058	*p*=0.288	*p*=0.086
n = (%)	95 (51.9%)	51 (60.7%)	26 (72.2%)	1.36 (0.79-2.34)	2.31 (1.02-5.22)	1.70 (0.70-4.10)	1.58 (0.97-2.58)

Dagegen wurde eine signifikante Assoziation zwischen Trägern einer *CARD15*–Mutation und der Erkrankung in jungen Jahren beobachtet (p = 0.014 für homozygote Träger versus Wildtyp; p = 0.029 für homozygote Träger versus heterozygote Träger). Das Auftreten von zwei *CARD15*–Mutationen konnte mit hoher Signifikanz erstens mit einer Beteiligung des terminalen Ileums (p = 0.008 versus Wildtyp) und zweitens mit einem stenosierenden Phänotyp assoziiert werden (p = 0.002 versus Wildtyp).

Patienten mit zwei *CARD15*–Mutationen neigten zudem tendenziell stärker zur Ausbildung von Fisteln (p = 0.063 versus Wildtyp), wobei hier sogar eine Signifikanz erreicht werden konnte, wenn man diese Patientengruppe mit Patienten mit nur einer *CARD15*–Mutation verglich (p = 0.027; Tabelle 3.1.1.1).

Der Phänotyp der Patienten mit Morbus Crohn wurde nach der „Wiener Klassifikation des Morbus Crohn“ von 1998 (Gasche et al. 2000) klassifiziert, wobei sich einige signifikante Assoziationen zwischen zwei veränderten *CARD15*–Allelen und der phänotypischen Ausprägung der Erkrankung zeigte. Die Träger zweier *CARD15*–Mutationen wiesen einen Befall vorzugsweise des Ileums und des Colons (ileocolonischer Phänotyp nach der Wiener Klassifikation, Vienna L3, 72.2 % der Patienten; p = 0.005 versus Wildtyp) als auch einen penetrierenden Phänotyp B3 des Morbus Crohn nach der Wiener Klassifikation auf (69.4 %; p = 0.027 versus heterozygote Merkmalsträger; Tabelle 3.1.1.1).

Alle homozygoten Merkmalsträger waren durch einen schwergradigeren Phänotyp nach der Wiener Klassifikation der Erkrankung charakterisiert (Phänotyp B2 nach Vienna = stenosierender Typ oder Phänotyp B3 nach Vienna = penetrierender Typ). Bei Patienten mit zwei *CARD15*–Mutationen wurde ebenfalls eine erhöhte Tendenz der Notwendigkeit einer operativen Versorgung der Erkrankung beobachtet (72.2 % der MC-Patienten mit zwei *CARD15*–Mutationen; p = 0.058 versus Wildtyp). Im Gegensatz dazu konnte kein Zusammenhang zwischen den drei *CARD15*-Mutationen und der Entstehung von Abszessen beobachtet werden.

3.1.2. Genotyp–Phänotyp-Korrelation einer Untergruppe von MC-Patienten mit einer Homozygotie für die Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11

Insgesamt wurden in der Kohorte von 303 Morbus Crohn-Patienten 19 Individuen ermittelt, die homozygot für die Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11 waren (4.3 % der MC-Patienten), während 43 Patienten heterozygote Träger dieser Mutation waren (9.7 % der MC-Patienten). Neun MC-Patienten (2 %) erwiesen sich als zusammengesetzt heterozygote Träger dieser Mutation (1007fs/R702W: n = 4; 1007fs/G908R: n = 5, Tabellen 3.1.2.1 und 3.1.2.2).

Bei allen 19 Patienten mit einer Homozygotie für die Insertionsmutation p.1007fs wurde die Diagnose eines Morbus Crohn gestellt. Das Alter dieser Patienten bei der Erstdiagnose lag signifikant unter dem der heterozygoten Träger der Insertionsmutation p.1007fs oder dem der Patienten ohne eine *CARD15*-Mutation ($p = 0.014$ versus Wildtyp und $p = 0.029$ versus heterozygote Merkmalsträger). Bei 12 von 19 Patienten (63.2 %) wurde der Morbus Crohn in einem Alter unter 26 Jahren diagnostiziert.

Eine Assoziation zwischen einer bestimmten Geschlechtsverteilung oder dem "body mass index" (BMI) und homoygoten Trägern der Insertionsmutation p.1007fs konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine Assoziation zu den Rauchgewohnheiten der homozygoten Patienten gezeigt werden ($p = 0.032$). Bei allen 19 Patienten war vorzugsweise das terminale Ileum befallen ($p = 0.001$ verglichen mit Wildtyp-Patienten und $p = 0.006$ verglichen mit zusammengesetzt heterozygoten Patienten; Tabellen 3.1.2.1 und 3.1.2.2). Ebenfalls zeigten alle 19 Patienten einen stenosierenden Verlauf der Erkrankung mit der Entwicklung von mindestens einer Stenose im Intestinaltrakt. Dabei wurden bei 18 der 19 Patienten (94.7 %) langstreckige Stenosen im Ileum mit einer Länge von 10 – 15 cm bei 12 Patienten und einer Länge von über 15 cm bei zwei der Patienten entweder radiologisch oder intraoperativ diagnostiziert (Tabelle 3.1.2.3 und Abbildung 3.1.2.1). Bei 16 der 19 Patienten (84.2 %) kam es im Rahmen der Stenosen zu Komplikationen, wobei eine operative Intervention bei 14 dieser Patienten notwendig wurde bzw. bei zwei Patienten durch den behandelnden Gastroenterologen angeraten wurde. Elf der 14 operierten Patienten (78.6 %), die sich einer Ileozökalresektion unterziehen mussten, entwickelten wiederholt eine Stenose an der

Anastomose (Restenosierung). Bei 12 der 19 Patienten (63.2 %) wurde aufgrund radiologischer oder operativer Befunde eine interne Fistel diagnostiziert, wobei bei 10 dieser 12 Patienten (10 von 19, 52.6 %) entero-enterale Fisteln nachgewiesen werden konnten (Tabelle 3.1.2.3).

Zusammenfassend konnte bei den 19 homozygoten Trägern der Insertionsmutation p.1007fs im Vergleich zu den zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern ein schwererer Krankheitsverlauf mit häufigerem Auftreten von Komplikationen beobachtet werden. Hauptlokalisation des Morbus Crohn war bei diesen 19 Patienten vorzugsweise das Ileocolon ($p = 0.019$ homozygote versus zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger; Tabelle 3.1.2.2) mit einer höheren Inzidenz für das Auftreten von Stenosen (100 % versus 77.8 % bei den zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern; $p = 0.296$).

Ebenso wurde ein höherer Anteil von Patienten mit einem penetrierenden Phänotyp (B3 nach der Wiener Klassifikation) in der Untergruppe der homozygoten p.1007fs-Mutationsträger im Vergleich zu zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern beobachtet, ebenso ein höherer Anteil von Patienten mit Fisteln (73.3 % versus 44.4 %) und Stenosen (100 % versus 77.8 %).

Allerdings erreichte aufgrund der kleinen Anzahl von Patienten in diesen beiden Untergruppen keines der beschriebenen Merkmale, in denen sich die Untergruppen unterschieden, eine statistische Signifikanz.

Tabelle 3.1.2.1: Genotyp-Phänotyp-Korrelation von Patienten mit der Insertionsmutation p.1007fs (c.3020insC) des *CARD15*-Gens

Der Phänotyp der Patienten mit Morbus Crohn wurde anhand der „Wiener Klassifikation des Morbus Crohn“ von 1998 eingeteilt (Gasche et al. 2000): Alter: < 40 Jahre (A1), > 40 Jahre (A2); Lokalisation der Erkrankung: terminales Ileum (L1), Colon (L2), Ileocolon (L3), oberer GI-Trakt (L4); Verlauf: nicht-stenosierend, nicht-penetrierend (B1); stenosierend (B2), penetrierend (B3) (RR = relatives Risiko (engl. "odds ratio"), KI = Konfidenz-Intervall (engl. "confidence interval"), CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung).

Tabelle 3.1.2.1: Teil I		**Wildtyp** **(0)** n=183	**heterozygoter Merkmalsträger** **(1)** n=43	**homozygoter Merkmalsträger** **(2)** n=19	***p*-Wert** **RR (KI)** **(0) vs. (1)**	***p*-Wert** **RR (KI)** **(0) vs. (2)**	***p*-Wert** **RR (KI)** **(1) vs. (2)**
Geschlecht							
weiblich	n = (%)	100 (54.6%)	21 (48.8%)	11 (57.9%)	*p*=0.502	*p*=0.814	*p*=0.588
männlich	n = (%)	83 (45.4%)	22 (51.2%)	8 (42.1%)	0.79 (0.41-1.54)	1.14 (0.44-2.97)	1.44 (0.48-4.28)
Positive Familienanamnese für eine CED					*p*=0.608	*p*=0.160	*p*=0.478
n = (%)		21 (11.5%)	6 (14.0%)	5 (26.3%)	1.25 (0.47-3.35)	2.38 (0.77-7.29)	1.90 (0.50-7.29)
"body mass index" (BMI)							
Mittelwert ± Standardabweichung		23.3 ± 4.2	23.0 ± 4.0	22.5 ± 3.1	*p*=0.673	*p*=0.334	*p*=0.620
Spannweite		16 - 40	16 – 32	17 – 29	N/A	N/A	N/A
Alter (Jahre)							
Mittelwert ± Standardabweichung		38.6 ± 12.4	40.0 ± 13.5	35.8 ± 10.6	*p*=0.556	*p*=0.291	*p*=0.200
Spannweite		15 - 73	17 – 69	20 – 58	N/A	N/A	N/A
Alter bei Erstdiagnose der CED (Jahre)							
Mittelwert ± Standardabweichung		28.7 ± 12.1	29.8 ± 13.6	23.9 ± 6.8	*p*=0.619	*p*=0.014	*p*=0.029
Spannweite		11 - 71	9 – 65	11 – 36	N/A	N/A	N/A
Erkrankungsdauer der CED (Jahre)							
Mittelwert ± Standardabweichung		10.0 ± 7.8	10.7 ± 8.5	11.9 ± 6.9	*p*=0.607	*p*=0.267	*p*=0.569
Spannweite		0 - 31	1 – 38	1 – 26	N/A	N/A	N/A

Tabelle 3.1.2.1: Teil II		**Wildtyp** **(0)** n=183	**heterozygoter Merkmalsträger** **(1)** n=43	**homozygoter Merkmalsträger** **(2)** n=19	***p*-Wert** **RR (KI)** **(0) vs. (1)**	***p*-Wert** **RR (KI)** **(0) vs. (2)**	***p*-Wert** **RR (KI)** **(1) vs. (2)**
Vienna A (Alter bei Erstdiagnose)					*p*=0.260	*p*=0.082	*p*=0.023
<40 Jahre	n = (%)	152 (83.1%)	32 (74.4%)	19 (100.0%)	0.61 (0.27-1.38)		
>40 Jahre	n = (%)	29 (15.8%)	10 (23.3%)	0			
Vienna L (Lokalisation)							
L1	n = (%)	11 (6.0%)	3 (7.0%)	3 (15.8%)	*p*=0.731 1.19 (0.32-4.46)	*p*=0.135 2.90 (0.73-11.47)	p=0.364 2.44 (0.44-13.38)
L2	n = (%)	36 (19.7%)	8 (18.6%)	0	*p*=1.000 0.95 (0.40-2.22)	*p*=0.049 N/A	*p*=0.049 N/A
L3	n = (%)	92 (50.3%)	25 (58.1%)	14 (73.7%)	*p*=0.391 1.42 (0.72-2.81)	*p*=0.089 2.71 (0.94-7.83)	*p*=0.391 1.90 (0.58-6.27)
L4	n = (%)	42 (22.9%)	6 (14.0%)	2 (10.5%)	*p*=0.297 0.55 (0.22-1.40)	*p*=0.257 0.39 (0.09-1.75)	*p*=1.000 0.71 (0.13-3.87)
Vienna B (Krankeitsverlauf)							
B1	n = (%)	36 (19.7%)	7 (16.3%)	0	*p*=0.828 0.81 (0.33-1.96)	*p*=0.049 N/A	*p*=0.088 N/A
B2	n = (%)	47 (25.7%)	12 (27.9%)	5 (26.3%)	p=0.703 1.14 (0.54-2.41)	*p*=1.000 1.01 (0.34-2.96)	*p*=1.000 0.89 (0.26-3.09)
B3	n = (%)	97 (53.0%)	23 (53.5%)	14 (73.7%)	*p*=1.000 1.04 (0.53-2.03)	*p*=0.144 2.40 (0.83-6.93)	*p*=0.258 2.31 (0.70-7.99)
Lokalisation des Crohn im Ileocolon					*p*=0.721	*p*=0.001	*p*=0.006
	n = (%)	119 (65.0%)	29 (67.4%)	19 (100.0%)	1.16 (0.56-2.39)		

Tabelle 3.1.2.1: Teil III	**Wildtyp** **(0)** n=183	**heterozygoter Merkmalsträger** **(1)** n=43	**homozygoter Merkmalsträger** **(2)** n=19	***p*-Wert** **RR (KI)** **(0) vs. (1)**	***p*-Wert** **RR (KI)** **(0) vs. (2)**	***p*-Wert** **RR (KI)** **(1) vs. (2)**
Stenose(n)				*p*=0.595	*p*=0.001	*p*=0.001
n= (%)	119(65.0%)	26 (60.5%)	19 (100.0%)	0.83 (0.42-1.67)		
Abszess(e)				*p*=0.862	*p*=1.000	*p*=1.000
n= (%)	70 (38.3%)	17 (58.1%)	7 (36.8%)	1.07 (0.54-2.12)	0.92 (0.34-2.44)	0.86 (0.28-2.62)
Fistel(n)				*p*=1.000	*p*=0.144	*p*=0.258
n= (%)	97 (53.0%)	23 (44.2%)	14 (73.7%)	1.04 (0.53-2.03)	2.40 (0.83-6.93)	2.31 (0.70-7.59)
Operationen aufgrund der CED				*p*=0.161	*p*=0.093	*p*=0.768
n= (%)	95 (51.9%)	28 (65.1%)	14 (73.7%)	1.72 (0.84-3.55)	2.53 (0.8-7.33)	1.30 (0.39-4.38)

Tabelle 3.1.2.2: Genotyp-Phänotyp-Korrelation der homozygoten und zusammengesetzt heterozygoten Träger der p.1007fs (c.3020insC)-Insertionsmutation.

Der Phänotyp der Patienten mit Morbus Crohn wurde anhand der „Wiener Klassifikation des Morbus Crohn“ von 1998 eingeteilt (Gasche et al. 2000): Alter: < 40 Jahre (A1), > 40 Jahre (A2); Lokalisation der Erkrankung: terminales Ileum (L1), Colon (L2), Ileocolon (L3), oberer GI-Trakt (L4); Verlauf: nicht-stenosierend, nicht-penetrierend (B1); stenosierend (B2), penetrierend (B3) (RR = relatives Risiko (engl. "odds ratio"), KI = Konfidenz-Intervall (engl. "confidence interval"), CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankung).

Tabelle 3.1.2.2: Teil I	**homozygote Träger der p.1007fs-Insertionsmutation (1)** n=19	**zusammengesetzt heterozygote Träger der p.1007fs-Insertionsmutation (2)** n=9	***p*-Wert RR (KI) (1) vs. (2)**
Geschlecht			*p*=0.689
weiblich n = (%)	11 (57.9%)	4 (44.4%)	1.72 (0.35-8.51)
männlich n = (%)	8 (42.1%)	5 (55.6%)	
Positive Familienanamnese für eine CED			*p*=0.280
n = (%)	5 (26.3%)	0	N/A
Alter (Jahre)			
Mittelwert ± Standardabweichung	35.8 ± 10.6	33.2 ± 11.7	*p*=0.578
Spannweite	20 – 58	17 – 54	N/A
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)			
Mittelwert ± Standardabweichung	23.9 ± 6.8	25.6 ± 11.6	*p*=0.711
Spannweite	11 – 36	9 – 50	N/A
Erkrankungsdauer der CED (Jahre)			
Mittelwert ± Standardabweichung	11.9 ± 6.9	9.6 ± 6.0	*p*=0.407
Spannweite	1 – 26	2 – 19	N/A

Tabelle 3.1.2.2: Teil II		**homozygote Träger der p.1007fs-Insertionsmutation (1)** n=19	**zusammengesetzt heterozygote Träger der p.1007fs-Insertionsmutation (2)** n=9	***p*-Wert RR (KI) (1) vs. (2)**
Vienna A (Alter bei Erstdiagnose)				
<40 Jahre	n = (%)	19 (100%)	7 (77.8%)	*p*=0.296
>40 Jahre	n = (%)	0	1 (11.1%)	N/A
Vienna L (Lokalisation)				
L1	n = (%)	3 (15.8%)	1 (11.1%)	*p*=1.000 1.12 (0.10-13.04)
L2	n = (%)	0	1 (11.1%)	*p*=0.269 N/A
L3	n = (%)	14 (73.7%)	4 (44.4%)	*p*=0.635 2.10 (0.34-12.86)
L4	n = (%)	2 (10.5%)	1 (11.1%)	*p*=1.000 0.71 (0.05-9.26)
Vienna B (Erkrankungsverlauf)				
B1	n= (%)	0	0	N/A
B2	n= (%)	5 (26.3%)	4 (44.4%)	*p*=0.375 0.36 (0.06-2.00)
B3	n= (%)	14 (73.7%)	4 (44.4%)	*p*=0.375 2.80 (0.50-15.66)

Tabelle 3.1.2.2: Teil III	**homozygote Träger der p.1007fs-Insertionsmutation (1)** n=19	**zusammengesetzt heterozygote Träger der p.1007fs-Insertionsmutation (2)** n=9	***p*-Wert RR (KI) (1) vs. (2)**
Lokalisation des Crohn im Ileocolon			
n = (%)	19 (100%)	5 (55.6%)	*p*=0.019
			N/A
Stenose(n)			
n = (%)	19 (100%)	7 (77.8%)	*p*=0.296
			N/A
Abszess(e)			
n = (%)	7 (36.8%)	3 (33.3%)	*p*=1.000
			0.97 (0.18-5.36)
Fistel(n)			
n = (%)	14 (73.7%)	4 (44.4%)	*p*=0.375
			2.80 (0.50-15.66)
Operationen aufgrund der CED			
n = (%)	14 (73.7%)	6 (66.7%)	*p*=1.000
			0.93 (0.14-6.23)

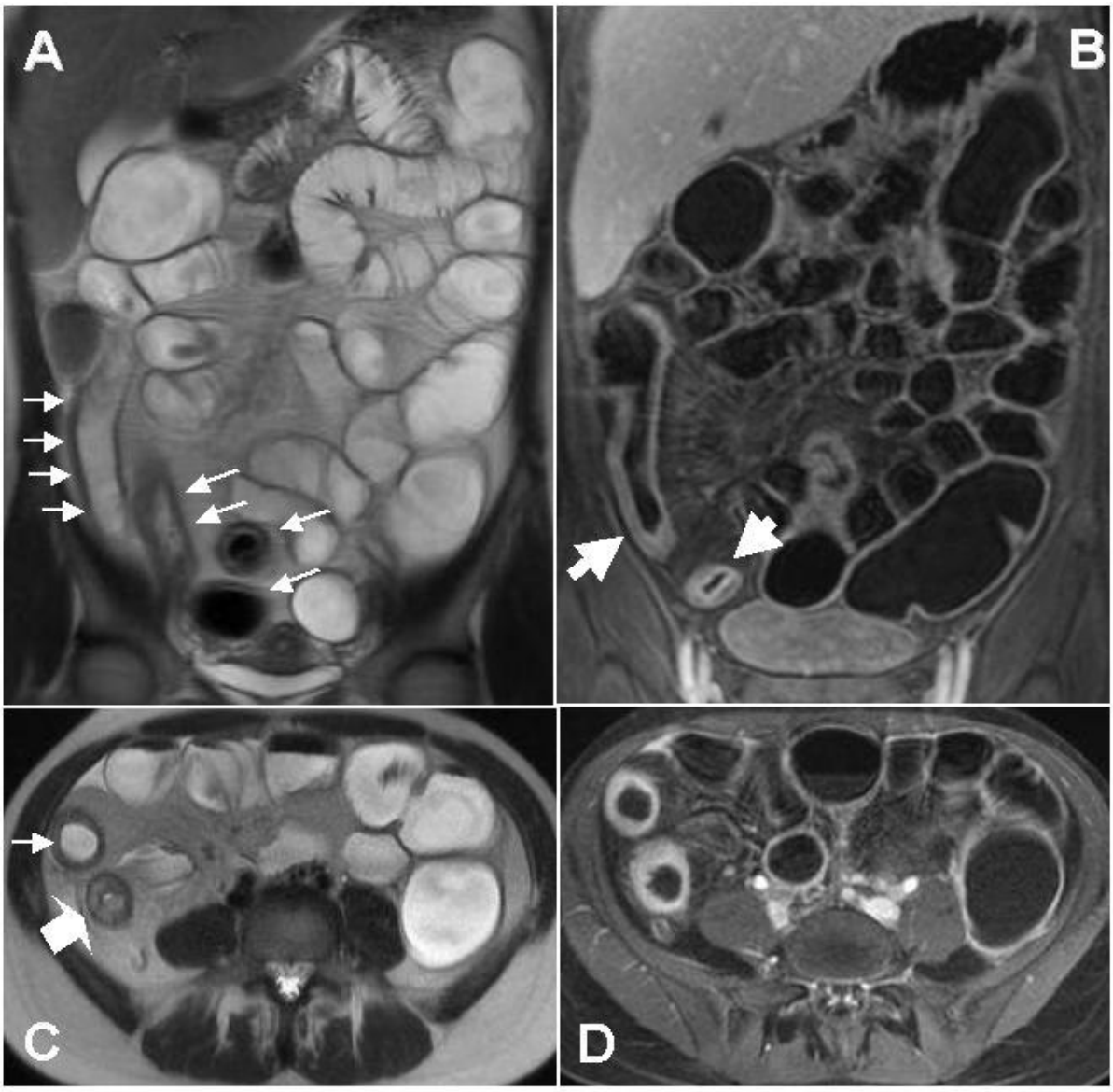
Tabelle 3.1.2.3: Klinische Charakteristika der 19 homozygoten Träger der p.1007fs-Mutation

Pat. #	Geschlecht	Wiener Klassifikation	Stenosen	Länge der Stenose	Fisteln	Operative Intervention	Restenosierung
1	♀	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	entero-enteral	**+**	+
2	♀	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	entero-enteral	**++**	+
3	♀	**L1**	terminales Ileum, Ileocolon	++	entero-enteral	**+**	nein
4	♀	**L4**	terminales Ileum, Ileocolon	+	keine	nein	nein
5	♂	**L3**	terminales Ileum	++	entero-enteral (Ileum-Sigma)	**++**	nein
6	♀	**L3**	terminales Ileum	++	perianal, entero-vaginal	**+++**	+
7	♀	**L3**	terminales Ileum	+++	perianal, entero-vaginal	nein	nein
8	♂	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	keine	**+**	+
9	♀	**L1**	terminales Ileum	++	perianal	**+**	+
10	♂	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	entero-enteral, entero-kutan	**+++**	+
11	♂	**L3**	terminales Ileum	++	entero-enteral	nein	nein
12	♀	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	perianal	**++**	+
13	♀	**L4**	terminales Ileum, Ileocolon	+++	entero-enteral	**+**	nein
14	♂	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	keine	**+**	+
15	♂	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon, Colon (mehrere)	++	entero-enteral, entero-kutan	**+++**	+
16	♀	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	keine	**+**	+
17	♀	**L1**	terminales Ileum	+	entero-enteral	**(+)**	nein
18	♂	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon	++	keine	**++**	+
19	♂	**L3**	terminales Ileum, Ileocolon, Colon (Sigmoid)	++	entero-enteral	**(+)**	nein

Diagnose: Diagnosestellung basierend auf Befunden aus klinischen, endoskopischen, radiologischen, biochemischen und histologischen Untersuchungen. Stenosen: Ileocolon: Jede Lokalisation der Erkrankung zwischen (einschließlich) der Ileozökalklappe (Bauhin'sche Klappe), Coecum und dem Colon ascendens. Länge der Stenose: + < 10 cm, ++ 10 – 15 cm, +++ > 15 cm. Operative Intervention: + einmalige Operation aufgrund eines Morbus Crohn (MC) oder Crohn-assoziierter Komplikationen; ++ zweimalige Operation aufgrund des Morbus Crohn, +++ mindestens drei Operationen aufgrund des Morbus Crohn. Restenosierung: + Restenosierung an der Anastomose. Lokalisation des Morbus Crohn anhand der „Wiener Klassifikation des Morbus Crohn" von 1998 (Gasche et al. 2000): terminales Ileum (L1), Colon (L2), Ileocolon (L3), oberer GI-Trakt (L4).

Abbildung 3.1.2.1: Abdomendarstellung mittels MRT-Enteroklysma bei einer 21jährigen Patientin mit Morbus Crohn nach intraintestinaler transjejunaler Installation von 0.5 % Methylcellulose–Lösung

Es werden T2-gewichtete ("weighted", w) "Half Fourier-acquired single shot turbo spin echo" (HASTE)-Sequenzen in koronarer (A) und transversaler Schichtdarstellung (C) und T1w-3D-fettgesättigte Gradienten-Echo-Sequenzen nach intravenöser Applikation von Gadolinium-DTPA (B: koronare Schicht; D: transversale Schicht) gezeigt. Dargestellt ist eine langstreckige Stenose im distalen und terminalen Ileum. Häufige Anschnitte desselben entzündeten Segmentes in unterschiedlicher Orientierung innerhalb einer Schnittebene (Bild A, kleine Pfeile) sprechen für den langstreckigen Charakter der Stenose. Eine umschriebene Wandverdickung der Darmwand verbunden mit einer erhöhten Kontrastmittelanreicherung in der Darmwand (Bilder B und C, große Pfeile) sind ein Indiz für eine hohe Aktivität des Entzündungsprozesses. Der Grad der Darmwandverdickung und die Ausbildung eines submukösen Ödems variieren dabei mit dem Grad des Entzündungsprozesses. Die in der T2-gewichteten Darstellung erkennbare Hyperintensität deutet auf die Ausbildung eines submukösen Ödems hin und erscheint in der akuten entzündlichen Phase des Prozesses (Bild C, großer Pfeil). Dagegen zeigen sich in der subakuten Phase des Entzündungsprozesses eine geringere Dickenzunahme der Darmwand und eine geringere submuköse Ausprägung des Ödems (Bild C, kleiner Pfeil).



3.1.3. Analyse einer Untergruppe von Morbus Crohn-Patienten, die zusammengesetzt heterozygote Träger der p.R702W Mutation in Exon 4 und der p.G908R Mutation in Exon 8 sind

Insgesamt waren 22 Patienten der Patientenkohorte (4.9 %) heterozygote Merkmalsträger der p.G908R-Mutation in Exon 8, während bei 47 Patienten ein Allel durch die von Exon 4 kodierte p.R702W-Mutation verändert war (10.6 %). Bei drei Patienten trugen beide Allele die p.R702W-Mutation (homozygote Merkmalsträger). Dagegen wurden in der untersuchten Patientenkohorte keine homozygoten Träger der p.G908R-Mutation detektiert.

Es konnte keine signifikante Beziehung zwischen der p.R702W-Mutation (n = 50 inklusive vier Patienten, die zusätzlich Träger der Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11 waren) und der Geschlechtsverteilung, einer auffälligen Familienanamnese, dem Alter bei Erstdiagnose der Erkrankung, einem speziellen Phänotyp nach der Wiener Klassifikation von 1998 (Gasche et al. 2000) oder der Ausbildung von Fisteln und Abszessbildung nachgewiesen werden ($p > 0.05$, Daten nicht gezeigt). Tendenziell zeigte sich allerdings eine Lokalisation der Erkrankung im Ileokolon, wobei diese Beobachtung aber keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0.064$ verglichen mit dem Wildtyp).

In der Untergruppe der Träger der p.G908R-Mutation (n = 22 inklusive fünf zusammengesetzt heterozygote Träger dieser Mutation in Kombination mit der Insertionsmutation p.1007fs) konnte durch eine Univarianzanalyse eine signifikante Assoziation der Notwendigkeit einer operativen Therapie des Morbus Crohn und dem Vorhandensein dieser Mutation gezeigt werden ($p = 0.034$). Im Vergleich zu Patienten ohne eine *CARD15*–Mutation zeigte sich zudem eine erhöhte Tendenz der p.G908R-Mutationsträger zur Ausbildung von Fisteln ($p = 0.063$).

Eine signifikante Assoziation zu weiteren phänotypischen Parametern der Wiener Klassifikation von 1998 fand sich dagegen bei p.G908R-Trägern nicht ($p > 0.05$; die entsprechenden Daten werden nicht dargestellt).

3.2. Ergebnisse der Studie II

"Eight novel *CARD15* variants detected by DNA sequence analysis of the *CARD15* gene in 111 patients with inflammatory bowel disease"

3.2.1. Neue *CARD1*-Varianten

Basierend auf der im Kapitel “Methoden” vorgestellten Detektionsmethode wurden die Exons 4, 5, 6, 8 und 11 bei Patienten, die 1.) Träger entweder mindestens einer der beschriebenen Hauptmutationen (p.R702W, p.G908R, p.1007fs), 2.) Träger einer neuen Aminosäuresubstitution, die von der 3´-Region von Exon 4 kodiert wird, oder 3.) Träger der c.2462+10A>C Variante waren, sequenziert.

Durch diesen Ansatz konnten bei 111 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen acht neue, bis jetzt noch nicht beschriebene *CARD15*–Varianten und eine neue Kombination kürzlich beschriebener *CARD15*–Mutationen detektiert werden (Abbildung 3.2.1.1, Tabelle 3.2.1.1).

Bei fünf CED-Patienten wurden *CARD15*–Genveränderungen im Bereich der sogenannten NOD-Domäne ("nucleotide-binding oligomerization domain", Aminosäuren 273-577) beobachtet. Zusätzlich zu einer kürzlich beschriebenen dominant-negativen Mutation (c.866 A>G [p.N289S]) in Kombination mit der p.R702W-Substitution bei zwei Patienten mit Morbus Crohn und einem Patienten mit Colitis ulcerosa wurde eine neue p.R391C-Veränderung bei einem Patienten mit indeterminierter Colitis und ein ebenfalls neuer p.P463A-Aminosäureaustausch bei einem CU-Patienten identifiziert.

In der Region zwischen der NOD-Domäne und den LRR´s ("leucine-rich repeats") des NOD2–Proteins, in der die häufig vorkommende p.R702W-Substitution lokalisiert ist, wurde ebenfalls ein neuer Aminosäureaustausch detektiert. Die p.R713H-Variante konnte in heterozygoter Form bei zwei MC-Patienten nachgewiesen werden. Sie befindet sich an einer Position, an der schon eine echte Mutation (c.2137 C>T [p.R713C]) beschrieben worden ist (Lesage et al. 2002).

Die meisten Mutationen und Varianten, die in dieser Studie detektiert wurden, sind allerdings in der LRR-Domäne lokalisiert, die die Aminosäuren 744-1020 umfaßt. Zusätzlich zu den bekannten und häufigen Mutationen p.G908R und p.1007fs wurden in dieser Studie fünf neue NOD2–Varianten gefunden (p.R760C, p.R790W, p.R791W, p.N825K, und p.A849V; Abbildung 3.2.1.1, Tabelle 3.2.1.1). All diese neuen Aminosäuresubstitutionen wurden bei Patienten mit einem Morbus Crohn detektiert, mit Ausnahme des p.R791W-Austausches, der bei einem Patienten mit indeterminierter Colitis auftrat.

Basierend auf den Ergebnissen funktioneller Analysen der französischen Arbeitsgruppe von Chamaillard et al. (Chamaillard et al. 2003a), wurden NOD2–Varianten, die sich hinsichtlich ihrer basalen NF-κB- und ihrer PGN (Peptidoglykan)–induzierten Aktivität nicht vom Wildtyp-Protein unterschieden, als Polymorphismen, d. h. als strukturelle Varianten ohne funktionelle Konsequenz gewertet.

Zwei solcher Aminosäuresubstitutionen wurden in der untersuchten Patientenkohorte detektiert, p.R311W (c.931 C>T) und p.R703C (c.2107 C>T; Tabelle 3.2.1.2). Der häufige c.802 C>T (p.P268S)-scheint dagegen zumeist im Kopplungsungleichgewicht mit den drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens aufzutreten (Cho et al. 2003, Hugot et al. 2001, Lesage et al. 2002). Chamaillard et al. untersuchte den Einfluss auch dieser NOD2–Variante (Chamaillard et al. 2003a). Vektoren mit der p.P268S-Variante und einer weiteren der drei Hauptmutationen und Konstrukte mit der p.P268S-Variante und zwei weiteren der drei Hauptmutationen zeigten eine vergleichbare basale und PGN-induzierte NF-κB-Aktivierung, womit bewiesen war, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt, der keinen Effekt auf die Funktion des NOD2–Proteins hat.

Dagegen wurde die c.2264 C>T (p.A755V)-*CARD15*–Variante bis jetzt noch nicht mit funktionellen Tests untersucht. Es handelt sich bei dieser Veränderung unter Berücksichtigung der Berechnungen von Dayhoff (Dayhoff et al. 1979) mit einer Austauschhäufigkeit der Aminosäuren von 10 % jedoch am ehesten um einen Polymorphismus.

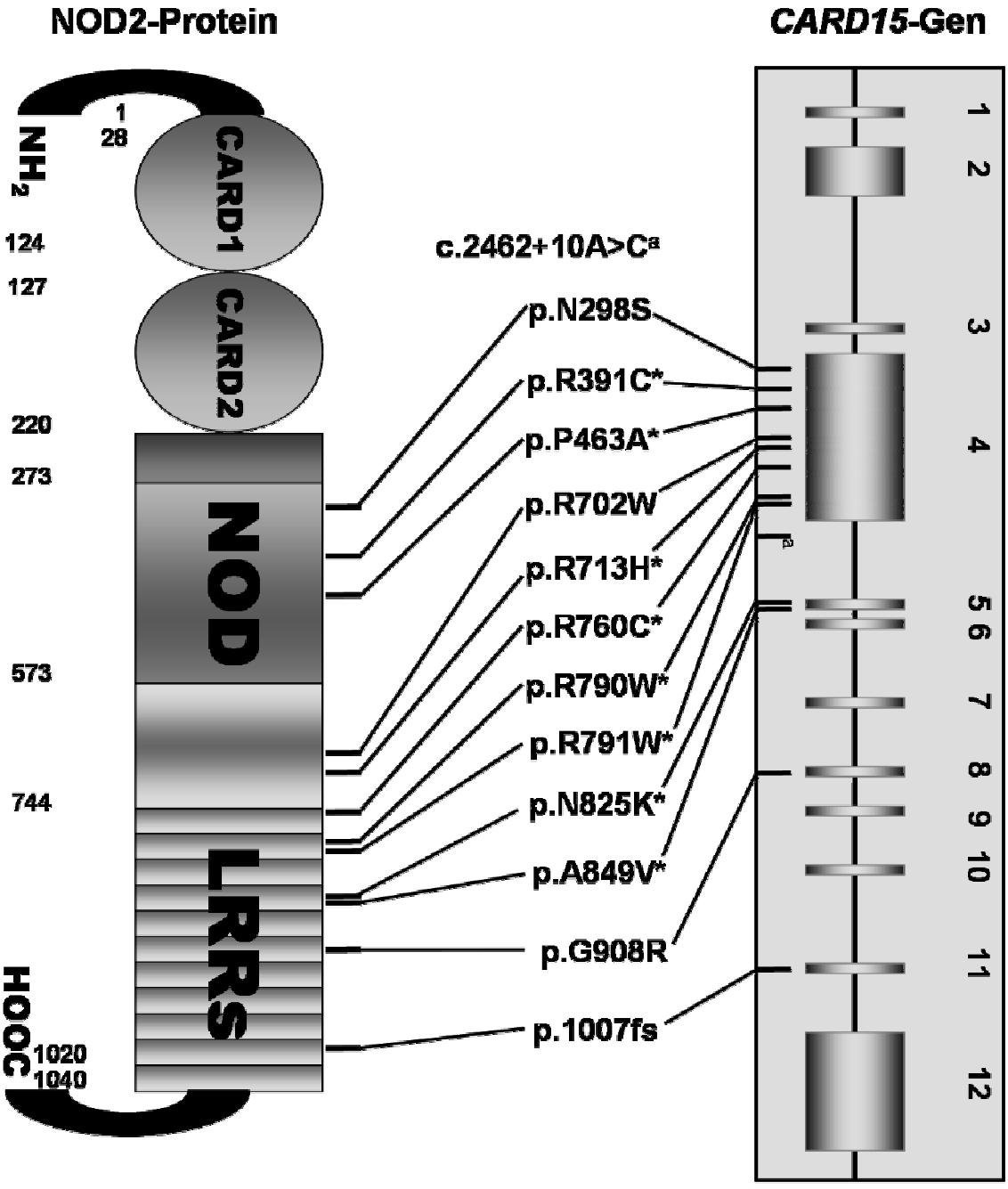


Abbildung 3.2.1.1: Struktur des NOD2-Proteins und des *CARD15*-Gens

Dargestellt ist die Position der *CARD15*–Varianten, die in dieser Studie detektiert wurden. Neue Mutationen sind durch einen Stern (*) markiert. (CARD = "caspase-activating recruitment domain", N-terminal, NBD = "nucleotide-binding domain", LRR = "leucine-rich repeats").

Tabelle 3.2.1.1

Lokalisation und Nukleotidaustausch	Aminosäuresubstitution	Dayhoff-Berechnungen[#] Häufigkeit eines AS-Austausches (%)	Protein-Domäne
Exon 4			
c.866A>G	*p.N289S*	19	**NBD**
c.1171C>T	***p.R391C**(neu)**	**0.9**	**NBD**
c.1387C>G	***p.P463A**(neu)**	**29**	**NBD**
c.2104C>T	*p.R702W*	2.4	
c.2138G>A	***p.R713H**(neu)**	**9.3**	
c.2278C>T	***p.R760C**(neu)**	**0.9**	**LRR1**
c.2368C>T	***p.R790W**(neu)**	**2.4**	**LRR2**
c.2371C>T	***p.R791W**(neu)**	**2.4**	**LRR2**
c.2462+10A>C	c.C.2462+10A>C		
Exon 5			
c.2475C>G	***p.N825K**(neu)**	**14**	**LRR4**
c.2546C>T	***p.A849V**(neu)**	**10**	**LRR4**
Exon 8			
c.2722G>C	*p.G908R*	0.55	**LRR6**
Exon 11			
c.3020insC	*p.1007fs*		**LRR10**

Tabelle 3.2.1.1: zeigt die *CARD15*-Varianten, die in der Kohorte von 111 CED-Patienten detektiert wurden. [#]Die Häufigkeit einer Aminosäuresubstitution wird angegeben als ein prozentualer Anteil an der absoluten Anzahl der Austausche, die für diese Aminosäure anhand der Berechnungen von Dayhoff beobachtet wurde (Dayhoff et al. 1979). (NBD = "nucleotide-binding domain", LRR = "leucine-rich repeats").

Tabelle 3.2.1.2

Lokalisation und Nukleotidaustausch	Aminosäure-substitution	Protein-Domäne	Anzahl (%) der mutierten Allele in der Patientenkohorte MC (n=178)	CU (n=38)	IC (n=6)
Exon 4					
c.802C>T	p.P268S	**zwischen CARD2 und NBD**	**93 (52.2)**	**17 (44.7)**	**4**
c.931C>T	p.R311W	**NBD**	**1**	**0**	**0**
c.1377C>T	p.R459R	**NBD**	**88 (49.4)**	**17 (44.7)**	**4**
c.1761T>G	p.R587R	**zwischen NBD und LRR1**	**59 (33.1)**	**12 (31.6)**	**2**
c.1833C>T	p.A611A	**zwischen NBD und LRR1**	**1**	**0**	**0**
c.2107C>T	p.R703C	**zwischen NBD und LRR1**	**6**	**0**	**0**
c.2264C>T	p.A755V	**LRR1**	**2**	**0**	**0**

Tabelle 3.2.1.2: *CARD15*-Polymorphismen, die bei den 111 CED Patienten detektiert wurden (CARD = "caspase-activating recruitment domain", N-terminal, NBD = "nucleotide-binding domain", LRR = "leucine-rich repeats").

3.2.2. Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit einer neuen *CARD15*–Variante

Als nächstes wurde der Phänotyp der 12 CED-Patienten (acht Patienten mit Morbus Crohn, zwei mit Colitis ulcerosa und weitere zwei mit indeterminierter Colitis), die entweder eine neue *CARD15*–Variante alleine oder zusammen mit einer schon beschriebenen *CARD15*–Mutation trugen oder aber sich durch eine neue Kombination von beschriebenen *CARD15*–Mutationen vom Wildtyp-Allel unterschieden (Tabelle 3.2.2.1).

Acht dieser 12 Patienten waren zusammengesetzt heterozygote Träger einer neuen und einer schon beschriebenen *CARD15*–Mutation, während vier nur heterozygot für eine neue *CARD15*–Variante waren, ohne daß eine weitere Mutation in den fünf analysierten Exons detektiert werden konnte. Die Mehrzahl der 12 Patienten hatte einen schweren Krankheitsverlauf der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung. Anhand der Wiener Klassifikation des Morbus Crohn-Phänotyps von 1998 (Gasche et al. 2000) wurden fünf Patienten einem penetrierenden Phänotyp zugeordnet, weitere vier einem stenosierenden Phänotyp und nur einer entsprach einem nicht-stenosierenden und nicht-penetrierenden Phänotyp der Erkrankung.

Dagegen präsentierten sich die beiden zusammengesetzt heterozygoten CU-Patienten ([p.N298S (+) p.R702W] und [p.P463A (+) p.R702W]) mit einer eher gering ausgeprägten klinischen Symptomatik.

Mit Ausnahme zweier Patienten (einer zusammengesetzt heterozygot p.A849V + p.1007fs, der andere mit der Kombination p.P463A + p.R702W) entwickelte sich bei allen Patienten im Krankeitsverlauf eine ausgeprägte Steroidabhängigkeit, wodurch eine Umstellung der medikamentösen Therapie auf eine intensivierte Immunsuppression unumgänglich war (Tabelle 3.2.2.1).

Darüberhinaus waren sechs der acht MC-Patienten dieser CED-Subkohorte zum Zeitpunkt der Diagnosestellung jünger als 40 Jahre alt (A1 nach Vienna). Interessanterweise waren die beiden jüngsten MC-Patienten (Alter bei Diagnosestellung 15 und 16 Jahre) zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger der Insertionsmutation p.1007fs in Exon 11 in Kombination mit jeweils einer neuen Aminosäuresubstitution in Exon 5 ([p.1007fs (+) p.N825K] und [p.1007fs (+) p.A849V). Bei fünf der

acht MC-Patienten mit einer neuen *CARD15*–Variante war vorzugsweise das terminale Ileum involviert. Bei drei dieser fünf MC-Patienten war zusätzlich das Kolon von der Erkrankung befallen. Bei einem Patienten mit zwei mutierten Allelen [p.1007fs (+) p.A849V] war das Jejunum und das proximale Ileum betroffen, während sich die beiden Träger der p.R713H-Aminosäuresubstitution mit einem isolierten Kolonbefall präsentierten (Tabelle 3.2.2.1).

Stenosen traten bei acht der 12 CED-Patienten mit neuen *CARD15*–Varianten oder einer neuen Kombination beschriebener *CARD15*–Mutationen auf. Speziell die zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträger litten unter einem ausgeprägt stenosierenden Phänotyp. Zum Beispiel traten bei drei Patienten (zwei Patienten als Träger der dominant-negativen Mutation p.N289S in Kombination mit der p.R702W-Mutation, beide kodiert von Exon 4, und ein weiterer Patient als zusammengesetzt heterozygoter Merkmalsträger der Insertionsmuation p.1007fs und der neuen p.R790W-Aminosäuresubstitution, die ebenfalls von Exon 4 kodiert wird) ausgeprägte Stenosen im terminalen Ileum auf, wobei sich diese Patienten mehrmaligen operativen Interventionen aufgrund der Stenosen und aufgrund postoperativer Komplikationen durch die vorangegangene Stenosierung bzw. Restenosierung unterziehen mussten. Darüberhinaus traten bei sechs der acht CED-Patienten mit zwei mutierten Allelen Stenosen im Gastrointestinaltrakt auf, während nur bei zwei der vier CED-Patienten mit einer neuen *CARD15*-Mutation Stenosen diagnostiziert wurden (Tabelle 3.2.2.1).

Bei fünf dieser 12-CED Patienten mit einer neuen *CARD15*–Variante wurden außerdem Fisteln diagnostiziert. Beide Patienten mit der p.R702W + p.N289S-Kombination litten unter entero-kutanen Fisteln. Rezidivierende perianale Fisteln traten bei einem zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträger für p.1007fs + p.N825K und bei einem weiteren heterozygoten Patienten mit dem p.R713H-Aminosäureaustausch auf.

Abszesse wurden bei dem MC-Patienten mit der p.R713H-Mutation und bei allen zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern mit Ausnahme des Trägers der p.1007fs + p.A849V-Kombination diagnostiziert.

Patient	Diagnose	Geschlecht	Genotyp	Alter bei ED [Jahre]	FA	Lokalisation der Erkrankung	Stenosen	Fisteln	Abszess	OP	Steroide	Immun-suppressiva
1	MC	♂	[p.N298S, Ex4 (+) p.R702W, Ex4]	32	nein	terminales Ileum	+++ terminales Ileum Konglomerattumor	++ entero-enteral, entero-cutan, perianal	ja	+++ a, b, c, g	steroidrefraktär	Azathioprin
2	MC	♀	[p.N298S, Ex4 (+) p.R702W, Ex4]	23	nein	terminales Ileum	+++ terminales Ileum	entero-cutan	ja	+++ a, c (2x), d, e, h	steroidrefraktär	Azathioprin, Infliximab
3	MC	♂	***[p.R790W, Ex4 (+)*** p.1007fs, Ex11]	52	ja, Kind	terminales Ileum, Colon	+++ terminales Ileum	nein	ja	+++ a, b, c, d, h	steroidrefraktär	Azathioprin, 6-Mercaptopurin
4	MC	♀	***[p.N825K, Ex5 (+)*** p.1007fs, Ex11]	15	ja, Bruder	terminales Ileum, Colon	Rektum	++ perianal	ja	++ f	steroidrefraktär	Azathioprin, 6-Mercaptopurin, Infliximab
5	MC	♀	***[p.A849V, Ex5 (+)*** p.1007fs, Ex11]	16	nein	Jejunum, proximales Ileum	++ Jejunum-Ileum >50 cm	nein	nein	Nein	nein	nein
6	MC	♂	***p.R713H (Ex4)***	41	nein	Colon descendens, Colon transversum	Colon descendens, Colon transversum	++ perianal	ja	+++ e, f (5x)	steroidrefraktär	Azathioprin
7	MC	♀	***p.R760C (Ex4)***	30	nein	terminales Ileum, Colon, Rektum	Colon ascendens, Colon transversum	nein	nein	Nein	steroidrefraktär	Azathioprin, 6-Thioguanin
8	MC	♂	***p.R713H (Ex4)***	37	nein	Colon, Rektum	nein	nein	nein	Nein	steroidrefraktär	Infliximab
9	IC	♀	***[p.R391C, Ex4 (+)*** p.G908R, Ex8]	19	nein	Colon	Colon descendens	nein	nein	Nein	steroidrefraktär	Azathioprin, 6-Mercaptopurin
10	IC	♀	***p.R791W (Ex4)***	23	ja, Cousine	Colon, Rektum	nein	perianal	ja	Nein	steroidrefraktär	Azathioprin, 6-Mercaptopurin
11	CU	♂	***[p.P463A, Ex4 (+)*** p.R702W, Ex4]	44	ja, Kind	Colon, Rektum	nein	nein	nein	Nein	nein	Azathioprin
12	CU	♀	[p.N289S, Ex4 (+) p.R702W, Ex4]	40	nein	Colon	nein	nein	nein	Nein	steroidrefraktär	Azathioprin

Tabelle 3.2.2.1: Klinische Charakteristika der Patienten mit einer neuen *CARD15*–Variante oder einer neuen Kombination von bekannten *CARD15*–Mutationen

Diagnose: Die Diagnosestellung erfolgte anhand von Befunden aus klinischen, endoskopischen, radiologischen, biochemischen und histologischen Untersuchungen. Genotyp: Neue CARD-Varianten sind mit einem (+) markiert. Stenosen: +++ Eine Restenosierung trat nach einer operativen Intervention auf; ++ Diese Patienten entwickelten langstreckige Stenosen > 15 cm im Dünndarm. Fisteln: ++ Rezidivierendes Auftreten von Fisteln nach operativer Intervention oder einer Therapie mit Immunsuppressiva. Operationen: +++ Drei oder mehr Operationen des Darmes; ++ Eine oder zwei Operationen des Darmes; a=Ileocoekalresektion; b=Hemikolektomie; c=Resektion der Anastomose; d=Partielle Resektion des Dünndarmes; e=Partielle Resektion des Colons; f=Fisteloperationen; g=Resektion eines Konglomerattumors, d. h. einer multiplen Verbackung von entzündeten Darmschlingen mit konsekutiver Obstruktion des Darmlumens; h=Ileostoma. Steroide: Steroidrefraktäre Patienten: Patienten, die mit einer Dosis der Steroide unter 10 mg/kg KG nicht in Remission blieben. ED=Erstdiagnose; FA=Familienanamnese (MC = Morbus Crohn, IC = Indeterminative Colitis, UC = Colitis ulcerosa).

4. Diskussion

4.1.1. Kritische Beurteilung des Studiendesigns und der Auswahl des Patientenkolletkivs

Das im Rahmen dieser beiden Studien untersuchte Patientenkollektiv repräsentiert eine große und homogene Kohorte von CED-Patienten kaukasischer Abstammung eines einzigen Zentrums, das sich auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen spezialisiert hat. Hiermit konnten einerseits Heterogenitäten in der Datenerhebung, die im Falle einer Beteiligung mehrerer Zentren auftreten könnten, und andererseits Einflüsse von genetischer Seite und durch Umweltfaktoren reduziert werden, da alle eingeschlossenen Patienten im süddeutschen Raum und hier vornehmlich in Bayern ansässig sind.

Die DNA-Sequenz des *CARD15*–Gens bzw. der Abschnitte, in denen die drei Hauptmutationen c.2104C>T [p.R702W], c.2722G>C [p.G908R] und c.3020insC [p.Leu1007fsX1008] liegen, konnte bei allen 445 in die Studie eingeschlossenen Patienten durch eine DNA-Sequenzanalyse ermittelt werden. Bei der ersten Studie "Homozygosity for the *CARD15* frameshift mutation p.1007fs predicts early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis" handelt es sich dabei um die zweitgrösste Sequenzierungsstudie überhaupt, die in Anlehnung an die von Lesage et al. publizierte durchgeführt wurde (Lesage et al. 2002).

Die dabei identifizierte Subkohorte an Morbus Crohn-Patienten mit einer Homozytogie für die Insertionsmutation c.3020insC [p.Leu1007fsX1008] repräsentiert zudem die größte phänotypisch charakterisierte Kohorte solcher Patienten, die in der Literatur beschrieben ist.

Im Rahmen der zweiten Studie "Eight novel *CARD15* variants detected by DNA sequence analysis of the *CARD15* gene in 111 patients with inflammatory bowel disease" wurde bei 111 CED-Patienten des Münchner Patientenkollektivs eine detailliertere *CARD15*-Sequenzanalyse durchgeführt. Die eingeschlossenen Patienten waren entweder heterozygote Merkmalsträger einer der drei Hauptmutationen **c**.2104C>T [p.R702W], c.2722G>C [p.G908R] und c.3020insC

[p.Leu1007fsX1008], der c.2462+10A>C-Variante an Position +10 in Intron 4 oder aber einer neuen *CARD15*-Mutation, die bei der Sequenzierung der 3´-Region des Exon 4 detektiert worden war. Durch die zusätzliche Analyse von Regionen des *CARD15*–Gens, in denen Lesage et al. die meisten *CARD15*–Mutationen detektiert hatten, also die zusätzliche komplette Sequenzierung des Exon 4 und der Exons 5 und 6, konnten innerhalb dieser Studie acht neue, bis dahin noch nicht beschriebene *CARD15*–Varianten identifiziert werden.

4.1.2. Häufigkeit der *CARD15*/NOD2–Varianten im untersuchten Patientenkollektiv

Die Prävalenz der *CARD1*–Mutationen lag bei den MC-Patienten unseres Patientenkollektivs aus Süddeutschland bei 39.6 %. Sie rangiert damit genau im Bereich von Prävalenzraten, die in anderen europäischen Kohorten beschrieben wurden (Abreu et al. 2002b, Ahmad et al. 2002, Cavanaugh et al. 2003, Cuthbert et al. 2002, Esters et al. 2004, Mendoza et al. 2003, Roussomoustakaki et al. 2003, Vermeire et al. 2002b, Helio et al. 2003, Bairead et al. 2003, Arnott et al. 2004, Lesage et al. 2002, Lakatos et al. 2005, Annese et al. 2004). Diese lagen im Mittel zwischen 35-45 %, mit Ausnahme von skandinavischen, irischen und schottischen Kollektiven von Morbus Crohn-Patienten (Helio et al. 2003, Bairead et al. 2003, Arnott et al. 2004), bei denen deutlich niedrigere Prävalenzraten beobachtet wurden. Interessanterweise konnten bei der japanischen, der chinesischen und auch der afroamerikanischen Bevölkerung keine *CARD15*–Mutationen nachgewiesen werden (Inoue et al. 2002, Sugimura M et al. 2003, Leong et al. 2003, Bonen et al. 2002). Dies verdeutlicht, dass Alterationen des *CARD15*–Gens nur teilweise für die genetische Prädisposition zu einem Morbus Crohn verantwortlich gemacht werden können, und dies auch nur in bestimmten Bevölkerungsgruppen. Generell machen *CARD15*-Defekte nur ungefähr 20 % der genetischen Prädisposition für einen Morbus Crohn aus (Vermeire et al. 2005).

Unsere Daten bestätigen ebenfalls die Beobachtung, dass *CARD15*–Mutationen häufiger bei MC-Patienten als bei Patienten mit einer Colitis ulcerosa zu beobachten sind. Die Häufigkeit dieser Mutationen liegt bei den UC-Patienten ungefähr im Bereich der der Normalbevölkerung, womit eine

Bedeutung dieser Veränderungen für die Entstehung einer Colitis ulcerosa sehr unwahrscheinlich wird bzw. ausgeschlossen werden kann.

4.1.3. Allgemeine Vorgehensweise bei der Mutationsanalyse des *CARD15*-Gens

Betrachtet man die Häufigkeiten und die Lokalisation der *CARD15*-Mutationen, so sollten bei einer initialen Genotypisierung des *CARD15*-Gens zunächst die Bereiche untersucht werden, in denen sich die drei Hauptmutationen p.R702W, p.G908R und p.1007fs befinden, also die 3´-Region des Exons 4, in der die Aminosäuresubstitution p.R702W lokalisiert ist, das Exon 8 (p.G908R Mutation) und das Exon 11 (Insertionsmutation p.1007fs). Dies kann zum Beispiel durch eine RLFP-basierte Methodik erfolgen. Damit können initial insgesamt über 80 % der bis jetzt beschriebenen mutierten *CARD15*-Allele detektiert werden.

Da speziell zusammengesetzt heterozygote und homozygote Merkmalsträger unter einem sehr schweren Krankheitsbild leiden, sollten diese schon sehr früh nach der Erstdiagnose einer CED identifiziert werden. Zusammengesetzt heterozygote und homozygote Träger einer der drei Hauptmutationen p.R702W, p.G908R und p.1007fs können bei der initialen Genotypisierung leicht identifiziert werden. Zur Detekion von zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern, die zusätzlich eine seltenere *CARD15*-Variante tragen, sollten bei CED-Patienten mit einem schweren Krankheitsbild im Rahmen einer erweiterten Genotypisierung die kompletten Exons 4, 5, 6, 8 und 11 durch eine DNA-Squenzierung untersucht werden.

Andererseits sollte die Sequenzanalyse des *CARD15*–Gens abgebrochen bzw. abgeschlossen werden, wenn keine der drei Hauptmutationen p.R702W, p.G908R und p.1007fs oder die c.2462+10A>C Variante gefunden wurden oder im Falle einer Homozytogie oder zusammengesetzten Heterozygotie für eine bzw. zwei Mutationen.

Die Strategie, die in dieser Studie angewendet wurde, basiert auf Ergebnissen einer großen Sequenzierungsstudie, die von der französischen Arbeitsgruppe unter Lesage et al. (Lesage et al. 2002) im Jahre 2002 durchgeführt wurde. In dieser Studie wurden alle 12 Exons des *CARD15*–Gens sequenziert. Dabei wurden in der ersten CARD-Domäne (Aminosäuren 28-124, kodiert durch Exon 2)

sowie im Exon 12 keine Mutationen entdeckt. In der zweiten CARD-Domäne (Aminosäuren 127-220, kodiert durch Exons 2 und 3) wurden insgesamt vier Aminosäuresubstitutionen beschrieben und nur drei weitere in den Exons 7, 9 und 10 (Lesage et al. 2002). Nur für zwei dieser sieben beschriebenen Veränderungen des *CARD15*–Gens (c.413 G>A [p.R138Q] and c.469 T>C [p.W157R]) konnte bis jetzt gezeigt werden, dass sie die Funktion des NOD2–Proteins beeinflussen und somit eine funktionelle Relevanz besitzen (Chamaillard et al. 2003a). Aus diesem Grund wurden in unserer zweiten Studie die Exons 2, 3, 7, 9, 10 und 12 nicht sequenziert.

Mit dieser limitierten Sequenzierungsmethode ist es theoretisch möglich, entweder 30.5 % (3´-Region von Exon 4 sowie Exons 8 und 11) oder 73.9 % (Exons 4, 5, 6, 8 und 11 komplett) der von Lesage et al. beschriebenen Veränderungen des *CARD15*–Gens zu detektieren, wobei theoretisch 87.5 % beziehungsweise 96.6 % der mutierten Allelen erfasst werden (Lesage et al. 2002).

4.1.4. „Ileitis terminalis“ und stenosierender Verlauf bei *CARD15*-Mutationsträgern mit einem Morbus Crohn

Generell ist das relative Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken, bei Veränderung eines Allels des *CARD15*–Gens durch eine der drei Hauptmutationen p.R702W, p.G908R und p.1007fs etwa 2-4 mal so hoch. Dieses relative Risiko erhöht sich auf das 20-40fache, wenn beide Allele des Patienten durch eine (homozygoter Merkmalsträger) oder durch zwei verschiedene *CARD15*–Mutationen verändert sind (zusammengesetzt heterozygoter Merkmalsträger) (Hampe et al. 2001b, Lesage et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Ahmad et al. 2002, Vermeire et al. 2002b, Bonen et al. 2003b, Akolkar et al. 2001, Cavanaugh et al. 2003, Newman et al. 2004, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001b).

Mehrere Studien, darunter viele europäische, untersuchten den Phänotyp bei Trägern von *CARD15*–Mutationen, wobei die stärkste und auch in allen Studien am besten replizierbare Assoziation die der drei Hauptmutationen mit einer Lokalisation der Erkrankung im terminalen Ileum, also mit einer „Ileitis terminalis“ war, wie sie Burrill Crohn, Leon Ginzburg und Gordon Oppenheimer bereits im Jahre 1932 im JAMA beschrieben hatten (Lesage et al. 2002, Abreu et al. 2002b, Ahmad et

al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Esters et al. 2004, Mendoza et al. 2003, Roussomoustakaki et al. 2003, Vermeire et al. 2002b, Helio et al. 2003, Lakatos et al. 2005).

Auch in unserem Patientenkollektiv aus Süddeutschland konnte diese starke Assoziation zwischen den *CARD15*-Mutationen und einer Lokalisation der Erkrankung hauptsächlich im terminalen Ileum gezeigt werden, verbunden mit einem komplizierten, fibrostenosierenden Krankheitsverlauf, wie er auch in zwei weiteren europäischen und einer amerikanischen Studie beschrieben worden ist (Studie II, Tabellen 3a und 3b) (Lesage et al. 2002, Abreu et al. 2002b, Lakatos et al. 2005).

Unsere Beobachtungen stimmen ebenfalls mit den Ergebnissen einer grossen Metaanalyse überein, die von einer griechischen Arbeitsgruppe im Jahre 2004 publiziert wurde (Economou et al. 2004). Diese auf den Ergebnissen von 42 größtenteils europäischen Studien basierende Metaanalyse untersuchte einerseits das Risiko, bei Vorhandensein einer oder zweier *CARD15*-Mutationen an einem Morbus Crohn zu erkranken und andererseits deren Einfluß auf den Phänotyp der MC-Patienten. Es konnte gezeigt werden, dass die *CARD15*-Mutationen signifikante Prediktoren eines schweren Krankheitsverlaufes sind, verbunden mit einer Hauptlokalisation der Erkrankung im terminalen Ileum (Economou et al. 2004).

Im Vergleich der Hauptmutationen des *CARD15*–Gens war das Risiko einer Erkrankung bei Vorhandensein der Insertionsmutation p.1007fs am höchsten (Economou et al. 2004). Obwohl in dieser Metaanalyse die Effekte für alle drei Hauptmutationen und deren Kombinationen bei zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern separat analysiert wurden, wurde keine Analyse einer Subkohorte von homozygoten Merkmalsträgern der Insertionsmutation p.1007fs hinsichtlich deren phänotypischer Krankheitsausprägung durchgeführt (Economou et al. 2004).

Auch generell wurden bis jetzt noch keine Genotyp-Phänotyp-Korrelationen speziell für homozygote Merkmalsträger einer *CARD15*/NOD2–Variante publiziert. Das liegt daran, daß, wie auch allgemein bei Assoziationsstudien, größere Fallzahlen benötigt werden, um statistisch signifikante und damit für den Kliniker verwertbare Effekte auf den Phänotyp zu ermitteln. Bei den in der Vergangenheit beschriebenen Subkohorten an homozygoten Merkmalsträgern der Insertionsmutation p.1007fs wurden aufgrund der geringen Anzahl (Lesage et al.: n = 11, Cuthbert et

al.: n = 6, Lakatos et al.: n = 13, Vavassori et al.: n = 7, Annese et al.: n = 14, Radlmayr et al.: n = 4) keine statistischen Analysen hinsichtlich des Phänotyps dieser Patienten durchgeführt (Lesage et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Lakatos et al. 2005, Vavassori et al. 2004, Annese et al. 2005, Radlmayr et al. 2002).

Das Patientenkollektiv unserer Studie enhält die größte Subkohorte an homozygoten Merkmalsträgern der Insertionsmutation p.1007fs, die phänotypisch sehr gut charakterisiert ist (n = 19, 4.3%). Wahrscheinlich ist diese Häufung an Patienten mit einem sehr schweren Krankheitsverlauf darin begründet, daß die Ambulanz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen der Universitätsklinik München die zentrale Anlaufstelle für CED-Patienten im süddeutschen Raum ist.

4.1.5. Homozygote Träger der Insertionsmutation p.1007fs als Hochrisikogruppe von MC-Patienten und Assoziation mit einem sehr schweren Krankheitsverlauf

Die Subkohorte der homozygoten Träger der Insertionsmutation p.1007fs stellt eine genetisch determinierte Hochrisikogruppe von Patienten mit Morbus Crohn dar, die besondere Charakteristika hinsichtlich iher Krankheitsausprägung und ihres Krankheitsverlaufs aufweist. Diese Patienten erkranken schon in jungen Jahren an einem Morbus Crohn (23,9 Jahre ± 6,8 Jahre), und die Erkrankung ist vorzugsweise im terminalen Ileum lokalisiert. Letzteres konnte bei allen 19 Patienten beobachtet werden. Es bildeten sich schon früh nach Krankheitsbeginn langstreckige Stenosen im terminalen Ileum und auch in anderen Darmabschnitten bei 18 der 19 Patienten aus (94,7 %). Selbst nach einer Ileozökalresektion kam es bei 78.6 % der Patienten zu einer Restenosierung. Eine operative Intervention aufgrund von Komplikationen war bei 73,7 % indiziert, teilweise mit der Notwendigkeit von multiplen operativen Eingriffen. Einen zusätzlichen fistulierenden Verlauf der Erkrankung mit Ausbildung von entero-enteralen Fisteln zeigte jeder zweite Patient dieser Hochrisikogruppe (52,6 %).

Die Identifizierung dieser Subkohorte an MC-Patienten macht nicht nur deutlich, dass es sich hierbei um einen sehr wichtigen Schritt in Richtung der Entwicklung einer neuen Klassifikation der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen auf der Grundlage der Genetik handelt. Vielmehr scheint eine sehr frühzeitige Identifizierung solcher Hochrisikopatienten durch genetische Analysen ganz neue

Möglichkeiten in der klinischen Versorgung dieser Patienten einerseits und andererseits aber auch in der Planung der Therapie, die ja gerade bei einem schweren Krankheitsverlauf frühzeitig durchgeführt werden sollte, zu eröffnen. Hinsichtlich der Diskussion bezüglich einer frühzeitigen Immunsuppression bei MC-Patienten mit einem schweren und progessiven Krankheitsverlauf könnte damit eine neue Möglichkeit zur frühzeitigen Identifizierung solcher Patienten geschaffen sein. Diese Hochrisikopatienten könnten möglicherweise präventiv, auch noch vor der raschen Progression der Erkrankung, einer Immunsuppression zugeführt werden. Vielleicht könnte damit der Krankheitsverlauf beispielsweise bei homozygoten Trägern der Insertionsmutation abgeschwächt werden, und zahlreiche Komplikationen, wie zum Beispiel die Entstehung von Fisteln oder Stenosen oder von sogenannten Konglomerattumoren im Bereich des terminalen Ileums, die mit höherer Inzidenz bei diesen Patienten auftreten (mit den damit verbundenen, oft multiplen Operationen), vermieden werden.

Die Ergebnisse dieser Genotyp-Phänotyp-Korrelation verdeutlichen, dass eine Untersuchung des *CARD15*–Gens gerade bei den MC-Patienten sinnvoll zu sein scheint, die schon in jungen Jahren an einem Morbus Crohn erkranken, einen Befall des terminalen Ileums aufweisen und Stenosen in diesem Abschnitt des Darmes ausbilden. Zurzeit spielt aber die Genotypisierung von CED-Patienten hinsichtlich des *CARD15*-Mutationsstatus in der klinischen Routine einerseits und andererseits auch als Kriterium bei der Patientenführung noch eine sehr limitierte bzw. untergeordete Rolle (Török et al. 2003).

Betrachtet man jedoch das Ausmaß und die Aggressivität des Krankheitsverlauf bei MC-Patienten mit einer Homozytogie für die Insertionsmutation p.1007fs, so scheinen gerade diese von einer frühen Diagnosestellung und einer frühzeitigen engen und interdisziplinären Zusammenarbeit zwischen der Gastroenterologie, der Radiologie und der Abdominalchirurgie zu profitieren. Diese Zusammenarbeit sollte zu einer routinemäßigen Bestandsaufnahme der Erkrankung seitens der Radiologie und einer frühzeitige Einleitung einer Therapie mit allen konservativen und auch operativen Optionen führen.

Die Datenlage hinsichtlich eines Einflusses der unterschiedlichen *CARD15*-Mutationen auf das Ansprechen einer medikamentösen Therapie und hier insbesondere der Immunsuppression ist

derzeit dagegen noch sehr limitiert. Im Falle des chimeren Antikörpers gegen TNF-α, Infliximab, konnten zwei Studien zeigen, dass *CARD15*-Mutationen keinen Einfluss auf das Ansprechen oder Nichtansprechen haben (Vermeire et al. 2002c, Mascheretti et al. 2002).

Bei MC-Patienten, die in die Hochrisikogruppe der homozygoten Träger der Insertionsmutation p.1007fs fallen, scheint aber die Anwendung einer immunsuppressiven Therapie schon in einem frühen Stadium der Erkrankung indiziert zu sein, um den raschen und progressiven Krankheitsverlauf bei diesen Patienten zu verlangsamen und/oder das Risiko einer Restenosierung nach einer operativen Versorgung zu reduzieren. Beide Ansätze werden aktuell auch in anderen Kohorten von MC-Patienten untersucht (Hanauer et al. 2003, Hanauer et al. 2004, Hommes et al. 2005).

Normalerweise wechselt während de Krankheitsverlaufs der Phänotyp der Erkrankung von einem primär inflammatorischen Typ (nicht-stenosierend und nicht-penetrierend) zu einem schwerwiegenderen, stenosierenden und penetrierenden Typ (Louis et al. 2001, Cosnes et al. 2002), was eine Einteilung des vorherrschenden Phänotyps nach z. B. der Wiener Klassifikation erschwert, da hierbei von einem konstant bleibenden Phänotyp ausgegangen wird (Gasche et al. 2000). Allerdings waren, wie aus der Tabelle 2 der Studie I ersichtlich, in der Patientenkohorte keine signifikanten Unterschiede in der Krankheitsdauer des Morbus Crohn zwischen MC-Patienten mit einer *CARD15*-Mutation und Patienten ohne eine dieser Mutationen zu beobachten.

Bei den MC-Patienten der Hochrisikogruppe der p.1007fs-Homozygoten wurde schon bei Diagnosestellung ein stenosierender und penetrierender Phänotyp des Morbus Crohn beobachtet. Verglichen mit anderen MC-Patienten der Münchner Kohorte zeigten diese Patienten auch eine raschere Progression im Krankheitsverlauf. Wichtig ist dabei ebenfalls, dass ungefähr Dreiviertel der MC-Patienten mit einer Homozytogie für die Insertionsmutation p.1007fs in die Gruppe mit dem schwersten Phänotyp der Wiener Klassifikation von 1998, dem penetrierenden Phänotyp B3, eingeteilt wurden (Gasche et al. 2000). Dies mag ursächlich darin begründet sein, dass die Insertionsmutation p.1007fs mit einer erhöhten Permeabilität der Darmwand einhergeht, was wiederum die rasche Progression des Morbus Crohn bei diesen Patienten erklären würde (Buhner et al. 2005). Zusätzlich scheinen Antikörper gegen Sacharomyces cerevisae (ASCAs) und Rauchen den Krankheitsverlauf

ebenfalls maßgeblich zu beeinflussen (Sutherland et al. 1990, Cosnes et al. 1996, Louis et al. 2003, Smith et al. 2004).

Zusammenfassend wurde im Rahmen unserer Genotyp-Phänotyp-Korrelation eine genetisch determinierte Hochrisikopopulation von MC-Patienten mit einer Homozytogie für die Insertionsmutation p.1007fs identifiziert. Betroffene Patienten zeigten einen sehr aggressiven Phänotyp der Erkrankung. Diese Beobachtungen lassen sich nur durch einen sehr stark funktionsmindernden Einfluss dieser Insertionsmutation auf die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems erklären. Weitere Studien sind notwendig, die die Funktion des NOD2–Proteins genauer untersuchen und die Rolle, die dieses Protein in der intestinalen Immunantwort spielt, besser definieren. Ziel soll es sein, biochemische Mechanismen zu identifizieren, die bei der Signalerkennung und der Signaltransduktion von NOD2 involviert sind. Dies könnte zur Identifikation neuer Proteine führen und möglicherweise neue Optionen für die Therapie und auch die Prophylaxe eröffnen.

4.1.6. Acht neue *CARD15*-Varianten sind bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa mit einem schweren Krankheitsverlauf assoziiert

Da sich das relative Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken, bei Veränderung eines Allels des *CARD15*-Gens um das 2-4fache erhöht und bei Veränderung beider Allele um das 20-40fache, also um den Faktor 10 weiter ansteigt, war das Hauptinteresse dieser Studie die Identifikation zusammengesetzt heterozygoter *CARD15*-Mutationsträger als möglicher weiterer Hochrisikogruppe von CED-Patienten (Hampe et al. 2001, Lesage et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Ahmad et al. 2002, Vermeire et al. 2002, Bonen et al. 2003, Akolkar et al. 2001, Cavanaugh et al. 2003, Newman et al. 2004, Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001b).

In die Studie „Eight novel *CARD15* variants detected by DNA sequence analysis of the *CARD15* gene in 111 patients with inflammatory bowel disease" wurden insgesamt 111 Patienten mit einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung eingeschlossen, deren Allele entweder durch eine der drei Hauptmutationen ([c.2104>T (p.R702W)] in Exon 4, [c.2722G>C (p.G908R)] in Exon 8 und

[c.3020insC (p.Leu1007fsXY1008)] in Exon 11) verändert war, oder die eine Mutation im Bereich der Exon-/Intron-Grenze von Exon 4 (c.2462+10A>C) aufwiesen. Auch Patienten, bei denen durch die Sequenzanalyse der 3´-Region des Exon 4 eine neue *CARD15*-Variante detektiert worden war, wurden eingeschlossen.

Durch die Sequenzanalyse der Regionen des *CARD15*-Gens, in denen von Lesage et al. 2002 (Lesage et al. 2002) die meisten möglicherweise krankheitsverursachenden Veränderungen beschrieben worden waren, also die Exons 4, 5, 6, 8 und 11, konnten in dieser Studie insgesamt acht neue, bis jetzt noch nicht beschriebene *CARD15*-Varianten in dieser CED-Patientenkohorte identifiziert werden (Ergebnisse der Studie II, Abbildung 3.2.1.1, Tabelle 3.2.1.1).

Zur Beantwortung der Frage, ob es sich bei diesen Veränderungen eher um Polymorphismen oder um wirkliche Mutationen handelt, die die Funktion des NOD2-Proteins beeinflussen, konnten in dieser Studie keine *in vitro*-Modelle herangezogen werden, wie sie von der Arbeitsgruppe von Chamaillard et al. im Jahre 2003 für einige schon bekannte *CARD15*-Mutationen beschrieben worden sind. Die Klassifizierung der neuen *CARD15*-Varianten in „Polymorphismus“ oder „Mutation“ mit folglicher Funktionsveränderung auf Proteinebene basiert in dieser Studie stattdessen auf Wahrscheinlichkeitsberechnungen von Dayhoff et al., die im Jahre 1979 veröffentlicht worden sind (Dayhoff et al. 1979). Häufig beobachtete Aminosäureaustausche entsprechen dabei eher Polymorphismen, die hinsichtlich der Funktion toleriert werden und somit die Eigenschaften des Proteins nicht wesentlich oder gar nicht beeinflussen. Aminosäureaustausche, die dagegen selten auftreten, werden hinsichtlich der resultierenden Proteinstruktur dagegen wahrscheinlich nicht so einfach toleriert und mindern die Funktion bis hin zum völligen Funktionsverlust des Proteins (Dayhoff et al. 1979).

Zusätzlich wurde bei den Patienten mit einer der neuen *CARD15*-Variante oder mit neuen Kombinationen beschriebener *CARD15*-Mutationen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation durchgeführt. Alle acht neuen *CARD15*-Varianten, die im Rahmen dieser Studie entdeckt wurden, kommen sehr selten vor (Häufigkeit < 1% der CED-Patienten) und wurden bei insgesamt neun der 111 eingeschlossenen CED-Patienten detektiert (sechs Patienten mit Morbus Crohn („CD“), zwei Patienten mit indeterminierter Colitis („IC“) und ein Patient mit einer Colitis ulcerosa („UC“)).

Bei fünf dieser Patienten waren beide Allele von einer Mutation betroffen, wobei jeweils ein Allel durch eine der drei Hauptmutationen c.2104C>T [p.R702W], c.2722G>C [p.G908R] und c.3020insC [p.Leu1007fsX1008] verändert war. Dies erschwerte die Genotyp-Phänotyp-Korrelation, die die Auswirkungen der neuen *CARD15*-Mutationen klären sollte. Bei vier der neun CED-Patienten war dagegen nur ein Allel durch eine neue *CARD15*-Mutation verändert. Die zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträger mit einer Kombination alte plus neue *CARD15*-Mutation präsentierten sich dabei mit einer deutlich schwereren Erkrankung als die Träger nur einer neuen *CARD15*-Variante (Studie II, Tabelle 3.2.2.1).

Bei allen zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern wurden Stenosen diagnostiziert, wobei bei vier dieser sechs Patienten sogar mehrere operative Interventionen aufgrund rezidivierender Stenosierungen notwendig waren.

Die beiden Patienten dieser Subkohorte mit dem frühesten Krankheitsbeginn (15 und 16 Jahre, Studie II, Tabelle 3.2.2.1) waren dabei Träger der p.1007fs-Mutation und einer neuen NOD2-Mutante, p.N825K bzw. p.A849V, die beide von Exon 5 des *CARD15*-Gens kodiert werden.

Alle p.N289S-Heterozygoten trugen eine weitere *CARD15*-Mutation in Exon 4, die zu einem p.R702W-Aminosäureaustausch führt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, daß die p.N289S-Mutante, die bei zwei MC-Patienten und einem UC-Patient detektiert wurde, in Kombination mit dem Wildtypallel in funktionellen Tests dominant-negative Eigenschaften aufweist (Chamaillard et al. 2003b), wie dies auch schon bei Pflanzen beobachtet worden ist (Tao et al. 2000). Die Kombination dieser beiden Mutationen führte dementsprechend zu einem ganz besonders schweren Krankheitsbild mit einem progressiven Krankheitsprozess, der bei den MC-Patienten vor allem im terminalen Ileum lokalisiert war (Studie II, Tabelle 3.2.2.1). Dies ist einerseits wahrscheinlich auf den Gendosis-Effekt infolge der Veränderung beider Allele zurückzuführen, andererseits aber sehr wahrscheinlich auch durch den zusätzlich funktionsmindernden dominant-negativen Effekt des p.N289S-Austausches bedingt.

Diese Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen der Studie von Lesage et al. überein, die ebenfalls ein schwereres Krankheitsbild bei Veränderung beider Allele des *CARD15*-Gens beschrieben hat, mit einer höheren Inzidenz von Stenosen im Vergleich zu Trägern nur einer *CARD15*-Mutation

(Lesage et al. 2002). Gendosis-Effekt wurden auch für die Kombination der p.R702W-Mutante mit der p.G908R-Mutante (Hugot et al. 2001) und für die Kombination mit der p.1007fs-Insertionsmutation (Hampe S et al. 2001b, Ogura et al. 2001b) beschrieben.

Andere Studien konnten zeigen, dass der Schweregrad der Erkrankung nicht nur mit der Anzahl der mutierten *CARD15*-Allele assoziiert ist, sondern auch mit der Dauer der Erkrankung (Cosnes et al. 2002, Louis et al. 2001). Auch in unserer MC-Patientenkohorte konnten wir diesen Zuammenhang kürzlich demonstrieren (Brand, Staudinger, Schnitzler et al. 2005a, Brand, Hofbauer, Dambacher, Schnitzler et al. 2005b). Allerdings zeigten sich bei Trägern einer neuen *CARD15*-Variante und einer schweren Krankheitsausprägung keine Unterschiede in der Krankheitsdauer, wenn sie mit Trägern einer häufigen *CARD15*-Mutation verglichen wurden (p=0.604). Dies ist am wahrscheinlichsten auf die geringe Anzahl der Patienten in dieser Subgruppe zurückzuführen.

Obwohl die neuen *CARD15*-Mutationen über die ganze kodierende Sequenz des *CARD15*-Gens mit Ausnahme der 5´-Region, die für die erste CARD-Domäne kodiert, verteilt sind, scheinen Mutationen bei MC-Patienten gehäuft in der 3´-Region der kodierenden Sequenz vorzukommen (Lesage et al. 2002). Die *CARD15*-Mutationen in der carboxylterminalen Region repräsentieren zudem den größten Anteil der bisher beschriebenen krankheitsverursachenden Veränderungen dieses Gens (Lesage et al. 2002).

Dementsprechend sind fünf (p.R760C, p.R790W, p.R791W, p.N825K und p.A849V) der acht neuen *CARD15*-Varianten, die in dieser Studie detektiert wurden, ebenfalls in der LRR ("leucine rich repeats")-Domäne lokalisiert (Studie II, Abbildung 3.2.1.1, Tabelle 3.2.1.1). Dies verdeutlicht die besondere Rolle der LRR-Region, die bekannterweise mit bakteriellem LPS interagiert, für die Funktion des NOD2-Proteins.

Anhand der Häufigkeiten (die drei Hauptmutationen repräsentieren über 80 % der mutierten Allele) und der Lokalisation der *CARD15*-Mutationen sollte deshalb die initiale Genotypisierung des *CARD15*–Gens auf die drei Hauptmutationen c.2104C>T (p.R702W), c.2722G>C (p.G908R) und c.3020insC (p.Leu1007fsX1008) beschränkt werden, zum Beispiel mit Hilfe RFLP-basierter Methoden.

Betrachtet man allerdings den Schweregrad der Krankheitsausprägung speziell bei zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern, scheint eine Genotypisierung weiterer Regionen des *CARD15*-Gens und hier insbesondere der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 bei Patienten mit einer schwereren Erkrankung und einem progressiven Krankheitsverlauf sinnvoll zu sein. Dabei sollten zunächst vorzugsweise die Exons mit einer hohen Mutationsfrequenz untersucht werden, also die Exons 4 und 5, wie die Ergebnisse dieser Studie und der Studie von Lesage et al. zeigen (Lesage S et al. 2002).

Zusammengefasst wurden im Rahmen der Analyse der DNA-Sequenz der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 des *CARD15*-Gens bei 111 Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen aus dem süddeutschen Raum acht neue *CARD15*-Varianten detektiert, wobei die meisten dieser Aminosäuresubstitutionen in der Pathogenese des Morbus Crohn eine Rolle zu spielen scheinen. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zeigte eine Assoziation dieser Veränderungen mit einem schweren Krankheitsbild, speziell bei zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern in Kombination mit einer der drei Hauptmutationen.

Bei fünf dieser Aminosäureaustausche (p.R391C, p.R713H, p.R760C, p.R790W und p.R791W) handelt es sich anhand der prozentualen Austauschfrequenzen von Dayhoff et al. und dem schweren Krankheitsbild dieser Patienten am wahrscheinlichsten um Mutationen. Eine Aminosäureaustauschfrequenz von 29 % für den Austausch von Prolin zu Alanin spricht dagegen bei der p.P463A-Variante eher für einen Polymorphismus.

Die beiden verbleibenden NOD2–Varianten p.N825K und p.A849V können mit Aminosäureaustauschfrequenzen von 14 % bzw. 10 % hingegen nicht eindeutig klassifiziert werden. Funktionelle Tests sind notwendig, um diese der Kategorie „Mutation“ oder „Polymorphismus“ zuordnen zu können.

Diese Studie zeigt auch, dass die Entwicklung eines einfachen und sensitiven Gentests wichtig ist, da die Ermittlung des *CARD15*-Mutationsstatus für den Kliniker ein wichtiges diagnostisches Mittel darstellt, um frühzeitig Individuen zu identifizieren, die einer Hochrisikogruppe von CED-Patienten angehören, die schon in jungen Jahren ein schweres Krankheitsbild entwickeln und entsprechend intensiv behandelt werden müssen.

Die hier angewendete Screeningmethode erlaubt es, schnell und effizient CED-Patienten zu identifizieren, die entweder Träger der drei Hauptmutationen, der c.2462+10A>C-Veränderung oder einer selteneren, von Exons 4 oder 5 kodierten *CARD15*-Variante sind.

4.2. Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Ätiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Um auf die Invasion des Organismus durch schädigende Pathogene zu reagieren und diese abwehren bzw. eliminieren zu können, hat das Immunsystem der Vertebraten viele unterschiedliche Abwehrmechanismen entwickelt, die generell dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem zugeordnet werden können (Inohara et al. 2005).

Das angeborene Immunsystem ist das primäre Abwehrsystem des menschlichen Körpers, das den menschlichen Organismus unspezifisch gegen potentiell schädigende Pathogene schützt. Es reagiert sofort oder in den ersten Stunden nach einer Invasion des menschlichen Körpers durch pathogene Organismen. Daher wird es als "first-line"-Immunabwehrsystem betrachtet, das bei einem Eindringen von schädigenden Organismen als erstes reagiert. Physikalische Barrieren des Organismus wie zum Beispiel die Haut oder die intestinale Mukosa sowie Zellen des Immunsystems, die körperfremde Zellen erkennen und eliminieren, werden diesem Immunsystem zugeordnet. Das angeborene Immunsystem reagiert dabei unspezifisch auf biochemische Eigenschaften und weniger auf die spezifischen Eigenschaften des Antigens (Bamias et al. 2005, Inohara et al. 2005).

Dagegen reagiert das erworbene Immunsystem auf spezifische Eigenschaften des Antigens (Bamias et al. 2005, Inohara et al. 2005). Das eingedrungene Antigen wird hierbei prozessiert und erkannt. Anschliessend wird eine Proliferation von Antigen-spezifischen Zellen des Immunsystems induziert, also von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, die dieses Antigen schneller erkennen und eliminieren können. Haupteigenschaften des erworbenen, adaptiven Immunsystems sind also Gedächtnis und Spezifität, die die Effektivität und Effizienz von Immunantworten auf bereits bekannte Antigene drastisch steigern können (Bamias et al. 2005, Inohara et al. 2005).

Das angeborene Immunsystem spielt somit als initiale Immunantwort auf eine primäre Invasion des Organismus durch Pathogene eine entscheidene Rolle in der Induktion des adaptiven Immunsystems und damit generell für die Effektivität des Immunabwehrsystems des menschlichen Körpers (Bamias et al. 2005, Inohara et al. 2005).

Die intestinale Mukosa muss als primäre physikalische Barriere zum Lumen des Verdauungssystems schnell Bedrohungen durch schädliche Pathogene im Lumen erkennen und eine kontrollierte Immunantwort einleiten, dabei aber gleichzeitig eine Immuntoleranz gegenüber ubiquitär vorkommenden harmlosen Antigenen und körpereigenen Antigenen aufrechterhalten (Cario 2005). Die initiale Erkennung von potentiellen Pathogenen, die den Organismus schädigen könnten, und die Differenzierung zwischen pathogenen und harmlosen Antigenen sowie zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen sind dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit entscheidend für die Funktion des menschlichen Immunsystems und den Erhalt der Immuntoleranz (Cario 2005, Inohara et al. 2005, Medzhitov et al. 2002).

Basierend auf der Erkennung von sogenannten “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs), also von Strukturen, die für jeden Organismus einzigartig sind und auch konstant bei Organismen einer Art vorkommen, durch sogenannte “pattern recognition receptors” (PRRs; auch “pattern recognition molecules” (PRMs) genannt) kann das angeborene Immunsystem zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen diskriminieren (Medzhitov 2001, Medzhitov et al. 2002). PRRs bzw. PRMs spielen damit also eine entscheidende Rolle bei der Pathogenerkennung und der Diskriminierung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen (Inohara et al. 2005, Medzhitov 2001, Medzhitov et al. 2002).

Eine Klasse von PRRs bindet extrazellulär an native oder opsonierte Pathogene (PAMPs) und vermitteln deren Elimination durch die Freisetzung von antimikrobiellen Faktoren und die Induktion des adaptiven Immunsystems (Inohara et al. 2005, Medzhitov 2001, Cairo 2005, Strober et al. 2006). Dieser Klasse von PRRs werden die sogenannten "Toll-like"-Rezeptoren (TLRs) zugeordnet (Inohara et al. 2005, Medzhitov 2001, Cairo 2005, Strober et al. 2006).

Bei einer anderen Klasse von PRRs handelt es sich um intrazellulär vorkommende PRMs, die dem menschlichen Organismus eine Immunität gegenüber der Invasion durch pathogene

Mikroorganismen über eine intrazelluläre Induktion des Immunsystems verleihen (Inohara et al. 2005, Medzhitov 2001, Cairo 2005, Strober et al. 2006). Dieser Klasse werden die sogenannten "nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-containing proteins", also die NOD-Proteine, zugeschrieben.

Ein Schutz des menschlichen Organismus vor pathogenen Mikroorganismen erfolgt dabei bei beiden Klassen von „Pathogenerkennungsrezeptoren“ über mindestens vier Wege:

1. Erkennung von "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs);
2. Expression dieser Proteine an der Grenze zum gastrointestinalen Lumen, also in der intestinalen Mukosa;
3. Induktion und Sekretion von pro/-anti-inflammatorischen Zyto- und Chemokinen, die das angeborene Immunsystem mit dem adaptiven Immunsystem verbinden;
4. Induktion von antimikrobiellen Effektorwegen.

Die Bedeutung dieser „Pathogenerkennungsrezeptoren“ (PRRs) wurde ursprünglich durch Untersuchungen der Fruchtfliege *Drosophila toll* und durch Beobachtungen bei Pflanzen erkannt, da diesen das klassische adaptive Immunsystem, wie es bei den Vertebraten vorkommt, gänzlich fehlt (Hulbert et al. 2001, Hoffmann 2003).

4.2.1. "Toll-like"-Rezeptoren (TLR): transmembranale Toxin-Rezeptoren

Die "toll-like receptors" gehören zur Familie transmembranal gelegener Rezeptoren vom Typ 1, die initial bei der Fruchtfliege *Drosophila toll* beobachtet wurden und im Rahmen der Immunabwehr gegen fungale, bakterielle und virale Pathogenen eine zentrale Rolle spielen (Abbildung 4.2.2.1, Seite 106) (Medzhitov 2001, Hoffmann et al. 2003, Akira et al. 2004, Cario 2005). Bis jetzt konnten insgesamt 11 solcher TLRs identifiziert werden, die sich strukturell sehr ähneln und generell aus drei Hauptkomponenten aufgebaut sind. Eine extrazellulär gelegenene Domäne, die bei allen Rezeptoren unterschiedlich aufgebaut ist, aber bei allen TLRs sogenannte "leucine-rich repeats" (LRRs) enthält, dient zur Pathogenerkennung. Als weitere Domänen enthalten TLRs eine kurze transmembrane

Einheit und eine Toll/Interleukin 1-Rezeptor-Domäne (TIR) im Zytoplasma (Abbildung 4.2.2.1, Seite 106) (Cario 2005). TLRs werden in vielen verschiedenartigen Zelltypen im gesamten Gastrointestinaltrakt exprimiert, wobei hier Epithelzellen des Magens, des Dünndarms und Colons sowie auch Monozyten/Makrophagen und dentritische Zellen als wichtigste zu nennen sind (Cairo et al. 2000a, Cairo et al. 2000b, Gerwitz et al. 2001, Fusunyan et al. 2001, Abreu et al. 2002a, Haller et al. 2002, Ortega-Cava et al. 2003, Suzuki et al. 2003, Otte et al. 2004, Ishihara et al. 2004, Cetin et al. 2004, Singh et al. 2005, Smith PD et al. 2001, Hausmann et al. 2002, Marodi 2006).

In ihrer Funktion bei der Erkennung von bakteriellen Toxinen durch Monozyten/Makrophagen sind aber nur TLR2 und TLR4 gut verstanden. TLR4 ist der Hauptrezeptor für bakterielles Lipopolysacharid (LPS), während TLR2 für die Erkennung von Peptidoglykanen, Lipoproteinen und Lipoteichonsäuren zuständig ist (Cario 2005, Inohara et al. 2005) Im Falle des TLR4 wird die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unter anderem über den Weg des TLR4-MD2-CD14-Rezeptorenkomplexes vermittelt. Lipopolysaccharide werden nach der Bindung an das aus dem Blutplasma stammende LPS-bindende Protein (LBP) von CD14 eingefangen. Durch die nachfolgende Anheftung an die extrazellulär gelegene, Leucin-reiche Domäne des TLR4 mit seinem akzessorischen Protein MD2 wird im Zytosol eine Enzymkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB führt. Dadurch wird die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie des IL-1, TNF-α, IL-6 und IL-8 eingeleitet. Andere bakterielle Pathogene wie etwa Proteoglykane werden von TLR2 gebunden. Auch die dadurch in Gang gesetzte Enzymkaskade führt zur Aktivierung von NF-κB und stimmt mit der des TLR4 weitgehend überein (Medzhitov 2001, Cario 2005, Inohara et al. 2005)

4.2.2. Die NOD-Familie (NOD1/NOD2): zytosolische Toxin–Rezeptoren

Parallel zu den extrazytosolisch lokalisierten "Toll-like"-Rezeptoren existieren ähnlich aufgebaute Toxinrezeptoren, die sich im Zytosol zahlreicher Zellen befinden (Abbildung 4.2.2.1, Seite 106). Hierzu zählen NOD1 (kodiert durch das "caspase recruitment domain 4"-Gen" *CARD4*) und NOD2 (kodiert durch das *CARD15*-Gen). Beschrieben wurden diese spezifischen Rezeptoren erstmals in der Botanik (Ogura et al. 2001b). Hier spielen sie eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr gegen Bakterien, Viren und Pilze (Inohara et al. 2001; Ogura et al. 2001b). Ursprünglich wurde angenommen, NOD2 sei wie TLR4 ein Rezeptor, der spezifisch Lipopolysaccharid (LPS) erkennt (Ogura Y et al. 2001b). Dies wurde zwischenzeitlich widerlegt. Funktionelle Untersuchungen haben stattdessen gezeigt, dass es sich bei NOD2 um einen Rezeptor mit alleiniger Affinität für Muramyldipeptid, ein spezielles Motiv von Peptidoglykanen (PGN), handelt (Inohara et al. 2003a, Girardin et al. 2003a). NOD1 hat dagegen eine hohe Affinität zu γ-D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), die ebenfalls in PGN enthalten ist, aber nur in denen Gram-negativer Bakterien (Girardin et al. 2003b, Chamaillard et al. 2003b).

Da PGN von Gram-positiven und von Gram-negativen Bakterien Muramyldipeptid enthalten, fungiert NOD2 also als ein genereller Sensor für fast alle Bakterien des intestinalen Lumens. NOD1 erkennt dagegen hauptsächlich Produkte von Gram-negativen Bakterien (Strober et al. 2006).

Strukturell werden NOD1 und NOD2 der sogenannten CATERPILLER-Proteinfamilie zugeordnet, die eine phylogenetische Konservierung der sogenannten NLR-Einheit, also der NOD– und der LRR ("leucine rich repeats")-Einheit, aufweist (Martinon et al. 2005, Inohara et al. 2003b, Chamaillard et al. 2003c, Ting et al. 2005, Ting et al. 2006).

Generell sind diese Proteine aus drei Domänen aufgebaut, der carboxy (C)–terminalen LRR–Einheit, die bei der Toxinerkennung eine Rolle spielt, einer zentral lokalisierten NOD-Einheit (auch als NACHT-Einheit bekannt), die die Eigeninduktion der Oligomerisation des Proteins unterstützt sowie eine ATPase-Aktivität besitzt, und einer amino (N)–terminalen Domäne; die aus Protein-Protein-Interaktionskassetten besteht, wie der Pyrin-Domäne oder im Falle des NOD2 aus CARD-Domänen.

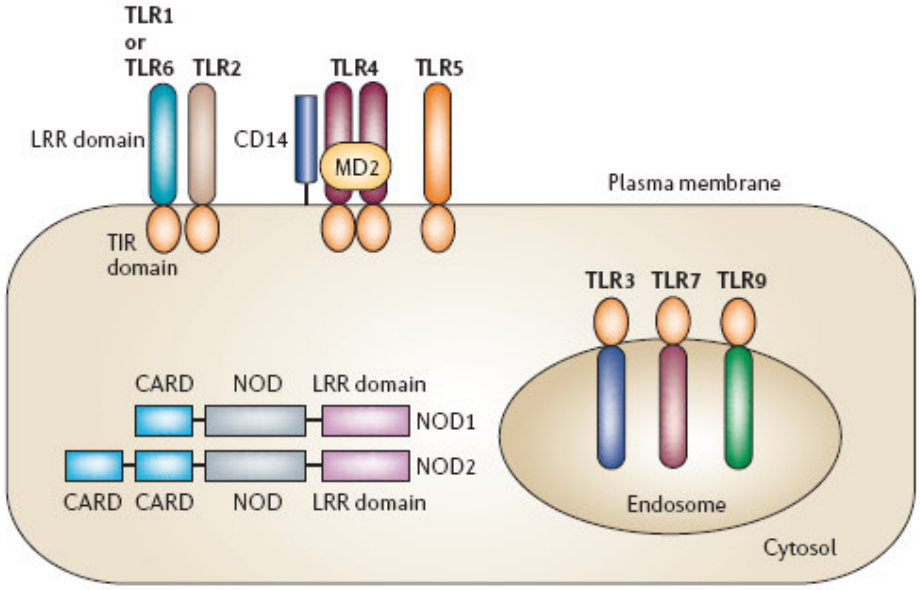


Abbildung 4.2.2.1: *Struktur und Lokalisation der NOD- und der TLR- Proteine in der Zelle.* Die zur NACHT-LRR ("leucine-rich repeat")-Familie (NLR-Familie) bzw. zur CATERPILLER-Familie gehörigen, intrazellulär lokalisierten Proteine NOD1 and NOD2 bestehen aus drei Domänen, der LRR-Domäne, der zentralen NOD-Domäne und einer CARD-Domäne bei NOD1 bzw. zwei CARD-Domänen bei NOD2. Im Gegensatz zu den NODs handelt es sich bei den TLRs um Proteine, die als Oberflächen-Rezeptoren an der Zellmembran oder in Endosomen zur Toxinerkennung dienen. Die TLRs bestehen aus einer extrazellulär gelegenen Domäne, die bei allen TLRs LRRs enthält, die aber bei den verschiedenen TLRs unterschiedlich aufgebaut ist, einer kurzen transmembranösen Einheit und einer Toll/Interleukin 1-Rezeptor-Domäne (TIR) im Zytoplasma (in Anlehnung an Strober et al. 2006).

4.2.3. Die Signaltransduktion durch NOD1 und NOD2

Die Erkennung von Muramyldipeptid (MDP) durch NOD2 bzw. von γ-D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) durch NOD1 über die C-terminale LRR-Domäne führt zu einer Aktivierung der NOD ("nucleotide-binding oligomerization domain")-Proteine NOD1 und NOD2. Diese Aktivierung führt über CARD-CARD-Interaktionen am aminoterminalen Ende dieser Proteine zu einer Rekrutierung der Serin/Threonin-Kinase Rip2/RICK ("RIP-like interacting CLARP kinase")/CARDIAK. Im Falle von NOD2 führt die Aktivierung von Rip2/RICK/CARDIAK zu einer K63 ($Lysin_{63}$)-assoziierten Polyubiquitierung von IKKγ (auch NEMO genannt), einer Untereinheit des NF-κB (IκB)–Kinasen-Komplexes (des sogenannten IKK-Komplexes), der neben IKKγ auch noch aus

den Untereinheiten IKKα und IKKβ aufgebaut ist (Strober et al. 2006). IKKγ ist gleichzeitig der Antagonist des Inhibitors des IKK–Komplexes, stellt also eine regulatorische Einheit des IKK-Komplexes dar, wobei seine Aktivierung in einer Phosphorylierung von IKKβ als auch in einer Phosphorylierung von IκB mündet mit konsekutiver Freisetzung des "nuclear factor-κB" (NF-κB) in den Nukleus. Hier interagiert NF-κB mit Promotorregionen der DNA und führt einerseits zur Transkription mehrerer für proinflammatorische Zytokine kodierender Gene (TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, Makrophagen-"colony-stimulating factor" (MCSF), Makrophagen-Granulozyten-CSF (MGCSF), "monocyte chemotactic protein 1" (MCP-1)) und andererseits zur Transkription der Adhäsionsmoleküle ICAM1, CD44 und TNFAIP6, die eine grosse Bedeutung bei der Rekrutierung von Entzündungszellen in infizierte Areale haben (Rogler et al. 1998, Strober et al. 2006, Inohara et al. 2005). Im Falle des NOD1 wurde eine NOD1-induzierte Polyubiquitierung von IKKγ durch RICK noch nicht untersucht. Auch der Mechanismus der NF-κB-Aktivierung ist bei NOD1 noch unklar (Strober et al. 2006).

Die Serin-Threonin-Kinase Rip2/RICK/CARDIAK kann neben der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB auch die Apoptose einleiten. Die Procaspase 9 gilt dabei im Falle von NOD1 als auch von NOD2 als Kopplungsagens der Apoptose (Inohara et al. 2001). NOD1 und NOD2 können also einerseits beide über CARD-CARD-Interaktionen mit der Serin-Threonin-Kinase Rip2/RICK/CARDIAK eine NF-κB-Aktivierung induzieren und andererseits eine Caspasen-abhängige Apoptose einleiten (Cario 2005, Inohara et al. 2005).

4.3. Funktion des NOD2–Proteins in der intestinalen Mukosa

NOD2 wird konstitutiv oder nach Induktion durch verschiedene Stimuli in Monozyten, in Makrophagen, in Lymphozyten des B- und T-Zellsystems, in dentritischen Zellen und in intestinalen Epithelzellen (IECs) inklusive der Panethschen Körnerzellen exprimiert (Pauleau et al. 2003, Gutierrez et al. 2002, Berrebi et al. 2003, Rosenstiel et al. 2003, Hisamatsu et al. 2003, Lala et al. 2003, Ogura et al. 2003). Die Expression von NOD2 kann interessanterweise durch die proinflammatorischen Zytokine TNF-α und IFN-γ in IEC-Zellkulturen induziert werden (Rosenstiel et

al. 2003). Dementsprechend ist die Expression von NOD2 in den Enterozyten unter normalen Bedingungen niedrig und im Rahmen einer Entzündung der Mukosa hochreguliert (Rosentstiel et al. 2003). Die exzessiv erhöhten TNF-α–Spiegel, die bei den CED beobachtet werden, bedingen somit eine stark erhöhte Expression von NOD2 in den Enterozyten (Rosentstiel et al. 2003). Wie bereits erwähnt, dient NOD2 zur intrazellulären Erkennung des MDP Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien in den genannten Zelltypen (Inohara et al. 2003a, Girardin et al. 2003a). Obwohl NOD2 mittlerweile als "MDP-Rezeptor" anerkannt ist, konnte die direkte und spezifische Bindung von MDP an den NOD2-Rezeptor bis jetzt noch nicht eindeutig gezeigt werden (Eckmann et al. 2005). NOD2 kann anschliessend über Rip2/RICK/CARDIAK die Transkriptionsfaktoren NF-κB, AP-1 und Elk-1 sowie Caspasen induzieren (Inohara et al. 2005). NOD2 stimuliert somit die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und die Einleitung der Apoptose in den genannten Zelltypen. In Epithelzellen konnte zudem gezeigt werden, dass NOD2 mit GRIM-19 interagiert (Barnich et al. 2005). Bei GRIM-19 handelt es sich um eine Untereinheit des NADH, des sogenannten Ubiquinon-Oxireduktase-Komplexes, eines Antagonisten von STAT3. Diese Interaktion führt in den Epithelzellen zu einer NOD2-abhängigen Aktivierung von NF-κB, obwohl die Supprimierung von STAT3 eigentlich theoretisch zu einer erhöhten Induktion des programmierten Zelltodes dieser Zellen führen müsste. NF-κB ist zudem ein potenter antiapoptotischer Faktor (Karin et al. 2002). Somit bewirkt NOD2 bei Stimulation durch MDP auch in Epithelzellen eine erhöhte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen.

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass NOD2 mit einer TGFβ-aktivierten Kinase 1, der TAK1, interagiert (Chen et al. 2004), die wiederum bei der Aktivierung des IKK–Komplexes und von NF-κB durch IL-1 bzw. durch TNF-α eine Rolle spielt (Takaesu et al. 2003). Eine normale TAK1-Funktion wird zur NOD2-abhängigen NF-κB–Aktivierung benötigt. Doch NOD2 scheint die Fähigkeit von TAK1, NF-κB in der Abwesenheit von RIP2 zu aktivieren, zu blockieren (Chen et al. 2004). Hier wird deutlich, dass noch einiges über die physiologisch relevanten Mechanismen der Signaltransduktion durch NOD2 herausgefunden werden muss.

Die Fähigkeit von NOD2, als Toxinrezeptor im Sinne eines "pattern recognition receptor" zu fungieren, ist heute allgemein anerkannt. Viele potentielle Signaltransduktionswege, die bei der

Entzündungsentstehung und für die angeborene Immunität eine Rolle spielen, wurden durch *in vitro*-Studien mit Hilfe von Zellkulturen identifizert. Die genauen physiologischen Funktionen von NOD2 *in vivo* bleiben bis jetzt aber relativ unverständlich. Um die Funktion von NOD2 besser zu definieren, sind Tiermodelle deshalb von enormer Bedeutung.

"Knock-out"-Mäusen, denen das *CARD15*–Gen fehlt, waren gesund und fertil, weshalb eine Bedeutung des NOD2-Proteins in der Entwicklung und im Wachstum weniger wahrscheinlich zu sein scheint (Kobayashi et al. 2005, Pauleau et al. 2003). Bei Exposition gegenüber hohen Dosen an bakteriellen Endotoxinen (LPS und MDP) zeigten sehr junge *CARD15*-"knock-out"–Mäuse eine deutlich höhere Resistenz gegenüber einer systemischen Infektion als ältere "knock-out"–Mäuse (Kobayashi et al. 2005, Pauleau et al. 2003). Interessanterweise überlebten die *CARD15*-"knock-out"-Mäuse eine systemische Infektion besser als die Wildtyp-Mäuse mit noch vorhandenem *CARD15*–Gen (Kobayashi et al. 2005). Zudem zeigten erwachsene *CARD15*-"knock-out"–Mäuse eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber oralen, nicht-systemischen Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, einem pathogenen Bakterium des Darms. Parallel hierzu wurde eine verminderte Expression der α-Defensine Defcr4 und Defcr-rs10, antimikrobiell wirksamer Peptide, in den Paneth'schen Zellen beobachtet, die enterische Bakterien (also auch *Listeria monocytogenes*) abtöten können (Kobayashi et al. 2005).

Zusammengenommen zeigen die Daten, dass NOD2 dem Organismus eine Immunität gegenüber MDP, einer Zellwandkomponente von Gram-posiviten und Gram-negativen Bakterien verleiht und eine Rolle bei der Abwehr systemischer Infektionen durch Pathogene, zumindest durch *Listeria monocytogenes*, spielen könnte.

Diese Funktion des NOD2 wurde durch eine weitere Beobachtung bestätigt. In der Studie wurden intestinale Epithelzellen (IECs) mit dem Wildtyp-*CARD15*-Gen transfiziert. Die *CARD15*–positiven Epithelzellen zeigten eine Resistenz gegenüber einer weiteren Art von invasiven Darmbakterien, den *Salmonellen*. NOD2 bewirkte eine Limitation der Invasion der Epithelzellen durch die *Salmonellen* und veringerte deutlich die Wachstumsrate von bereits in den Epithelzellen befindlichen *Salmonellen* (Hisamatsu et al. 2003). Auch die Ergebnisse dieser Studie sprechen für eine direkte oder indirekte antimikrobielle Wirkung von NOD2.

Allerdings wird NOD2 normalerweise nicht in den intestinalen Epithelzellen exprimiert. Einzige Ausnahme sind die Paneth'schen Zellen, die in hoher Dichte im terminalen Ileum zu finden sind, dem Hauptmanifestationsort des Morbus Crohn. Interessanterweise sind die drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens p.R702W, p.G908R und insbesondere die Insertionsmutation p.1007fs mit einer Lokalisation des Morbus Crohn im terminalen Ileum assoziiert.

4.4. Beeinflussung der Funktion des NOD2-Proteins durch Mutationen im *CARD15*–Gen

Schon im Jahre 2001 bei Erstbeschreibung von Mutationen des *CARD15*–Gens untersuchten Ogura et al. die Insertionsmutation p.1007fs (oder c.3020insC) in funktionellen Tests. In dieser Studie wurden periphere mononukleäre Zellen des Blutes ("peripheral blood mononuclear cells", PBMC) von Individuen verwendet, die homozygote Träger der Insertionsmutation c.3020insC (L1007fsinsC) waren. Es konnte einerseits eine erhöhte NF-κB-Aktivierung (durch EMSA induziert) und andererseits eine erniedrigte Expression von IL-1β nach Stimulation mit MDP, nicht aber mit LPS, bei homozygoten Trägern dieser Mutation nachgewiesen werden. PBMCs von heterozygoten Merkmalsträgern verhielten sich dagegen wie die von *CARD15*-Wildtyp-Trägern hinsichtlich der NF-κB-Aktivierung und der Expression von IL-1β (Ogura Y et al. 2001b).

Auch gesunde Merkmalsträger, die nicht an einem Morbus Crohn erkrankt waren, wiesen diesen biochemischen Defekt im NOD2-Transduktionsweg auf. Dies verdeutlicht, dass diese genetische Veränderung nicht alleine ausreicht, um an einem Morbus Crohn zu erkranken, und andere Faktoren wie zum Beispiel Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen scheinen bzw. deren Zusammenspiel in einem genetisch prädisponierten Individuum zur Erkrankung führt (Ogura et al. 2001b).

Eine andere Arbeitsgruppe um Chamaillard et al. untersuchte 32 der in der grossen Sequenzierungsstudie von Lesage et al. beschriebenen NOD2-Varianten hinsichtlich ihres Einflusses auf die Funktion des NOD2-Proteins. Unter Verwendung von Expressionsassays konnten Chamaillard et al. diese NOD2-Alterationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit, NF-κB basal und nach Stimulation mit MPD zu aktivieren, in verschiedene Gruppen einteilen (Chamaillard et al. 2003a).Die Aminosäureaustausche p.R702W und p.G908R, die mit einem Morbus Crohn assoziiert werden

konnten, führen beide zu einer reduzierten basalen Aktivierung von NF-κB und auch zu einer geringeren Aktivierung von NF-κB nach Stimulation mit MDP (Chamaillard et al. 2003a). Die Insertionsmutation c.3020insC zeigte dagegen nur eine reduzierte Aktivierung von NF-κB nach Stimulation mit MDP, während die basale NF-κB-Aktivierung unbeeinträchtigt war (Chamaillard et al. 2003a). Bei Betrachtung der Lage dieser Mutationen im NOD2-Protein wird die funktionseinschränkende Wirkung der c.3020insC-Mutation in der Erkennung von MDP deutlich (Abbildungen 4.4.1 und 4.4.2).

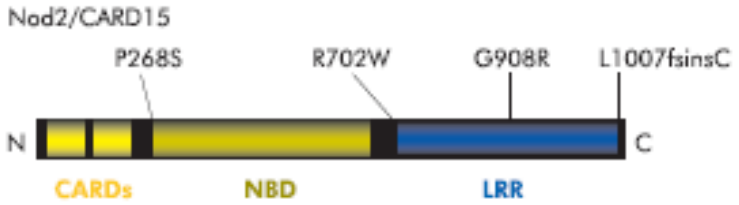


Abbildung 4.4.1: Darstellung der drei Hauptmutationen des *CARD15*–Gens und einer weiteren, P268S, die aber nahezu immer gleichzeitig mit den drei Hauptmutationen auftritt und daher als Polymorphismus betrachtet wird (in Anlehnung an Cario 2005).

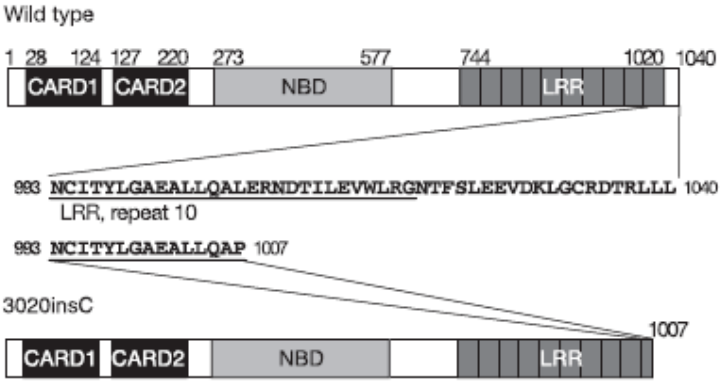


Abbildung 4.4.2: Darstellung des NOD2-Proteins, oben mit der normalen Länge von 1040 Aminosäuren, und darunter das verkürzte NOD2-Protein, das durch den Abbruch der Translation im Bereich des Kodons 1007 entsteht (in Anlehnung an Ogura et al. 2001b).

Die Insertion eines Cytosins an Nukleotidposition 3020 des *CARD15*–Gens resultiert in einer Rasterverschiebung im Bereich des zweiten Nukleotids von Kodon 1007, mit einer konsekutiven Substitution von Leucin durch Prolin im Bereich des 10. LRRs der LRR-Domäne. Auf dieses Kodon folgt direkt ein vorzeitiges Stopkodon, wodurch die Translation nach 1007 Aminosäuren abbricht. Es entsteht ein nicht vollständiges NOD2-Protein mit nur 1007 statt 1040 Aminosäuren (Abbildung 4.4.2) (Ogura et al. 2001b). Somit ist die Funktion der LRR-Domäne eingeschränkt, die ja für die Erkennung des MDP von essentieller Bedeutung ist, und es resultiert eine verringerte NF-κB–Aktivierung nach Stimulation dieses fehlerhaften NOD2-Proteins mit MDP (Ogura et al. 2001b).

Ein häufig erwähnter Kritikpunkt hinsichtlich der Methodik der Studien, die transgene Expressionsmodelle von NOD2 verwenden, ist, dass extrem geringe Mengen an *CARD15*-Plasmiden eine enorme Potenz aufweisen, NF-κB ligandenunabhängig aktivieren zu können (Abreu 2005). Dies erschwert den Vergleich zwischen der Aktivierung von NF-κB vor und nach Stimulation durch den spezifischen Liganden von NOD2, MDP. Die Limitierung von *in vitro*-Studien besteht andererseits darin, dass natürliche Reaktionspartner oder Inhibitoren von NOD2 in diesen Assays entweder ganz fehlen oder nicht in der korrekten stöchiometrischen Menge wie *in vivo* vorhanden sind. Dies kann möglicherweise zu einer falschen Beurteilung der durch *CARD15*-Mutationen verursachten Funktionseinschränkung des NOD2-Proteins führen bzw. die Wertigkeit der Beurteilung einschränken (Abreu 2005). Vergleicht man jedoch die Ergebnisse dieser experimentellen Studien mit den Ergebnissen der Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, so zeigt sich, dass die Einteilung der *CARD15*-Mutationen in mehr oder wenige funktionseinschränkende Veränderungen mit dem Phänotyp der Patienten korreliert. Auch in unserer Kohorte zeigten die homozygoten Merkmalsträger der c.3020insC-Mutation einen besonders schweren Krankheitsverlauf mit vielen Komplikationen. Damit wird die deletäre Wirkung dieser Mutation, die auch *in vitro* gezeigt werden konnte, unterstrichen. Auch der Hauptmanifestationsort der Erkrankung, der bei MC-Patienten mit einer Homozygotie für die Insertionsmutation c.3020insC im terminalen Ileum lokalisiert ist, kann dadurch möglicherweise erklärt werden, denn die höchste Expressionsrate von *CARD15* wurde in den Paneth'schen Zellen beobachtet (Lala et al. 2003, Ogura et al. 2003), die wiederum in sehr hoher Dichte im terminalen Ileum vorkommen.

MC-Patienten mit zwei mutierten Allelen sind durch einen schwereren Krankheitsverlauf als heterozygote Merkmalsträger charakterisiert (Lesage et al. 2002). Auch dies bestätigte sich in unserer Patientenkohorte. Der Gendosis-Effekt spielt also ebenfalls eine Rolle in der Funktionseinschränkung von NOD2.

Hinsichtlich der neuen Mutationen, die im Rahmen der zweiten Studie ermittelt werden konnten, sind zur genauen Beurteilung der „Dignität“ dieser Veränderungen ebenfalls funktionelle Tests notwendig. Für unsere Beurteilung der funktionellen Konsequenzen dieser Veränderungen wurden die Berechnungen von Dayhoff et al. herangezogen, die auf Beobachtungen von Aminosäureaustausch-Häufigkeiten beruhen. Sechs der neun Patienten mit einer neuen *CARD15*-Variante waren zudem Träger einer zweiten, häufigen *CARD15*-Mutation, was die Beurteilung der Auswirkungen auf den Phänotyp zusätzlich erschwerte.

Speziell die p.N825K- und die p.A849V-Variante können mit Aminosäureaustausch-frequenzen von 14 % bzw. 10 % nach den Berechnungen von Dayhoff et al. nicht eindeutig klassifiziert werden. Hier können die Auswirkungen auf die Proteinfunktion nur durch funktionelle Tests endgültig geklärt werden (Dayhoff et al. 1979).

4.5. Modelle zur Erklärung der Pathophysiologie des mutierten NOD2

Mehrere *in vitro*-Studien zeigten, dass diejenigen *CARD15*-Mutationen, die mit einem Morbus Crohn assoziiert werden konnten, also p.R702W, p.G908R und p.1007fs, hauptsächlich die LRR-Domäne des NOD2-Proteins beeinflussen. Damit scheinen sie die Fähigkeit des NOD2-Proteins einzuschränken, MPD zu erkennen und nachfolgend den NF-κB-Signalweg zu induzieren (Chamaillard et al. 2003a, Bonen et al. 2003a). Somit wäre also zu erwarten, dass diese Mutationen einen Funktionsverlust ("loss-of-function") des Proteins bedingen. Übereinstimmend hiermit scheinen die meisten der *CARD15*-Mutationen in einer autosomal rezessiven Weise zu wirken (Economou et al. 2004).

Darüberhinaus konnte unter Verwendung von Monozyten homozyoter Träger der Insertionsmutation c.3020insC demonstriert werden, dass diese viele Defekte hinsichtlich der

Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel TNF-α, IL-6 und IL-8 als auch hinsichtlich der Produktion des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 aufwiesen (Netea et al. 2004, van Heel et al. 2005).

Im Gegensatz hierzu ist der Morbus Crohn *in vivo* aber gerade mit dem Vorhandensein von aktiviertem NF-κB in den Nucleoli von Epithelzellen (IECs) und von Makrophagen in der Lamina propria des Intestinaltraktes assoziiert. Eine erhöhte Expression von Zielgenen des NF-κB wie TNF-α, IL-1β und IL-6 mit konsekutiver Sekretion dieser Mediatoren in entzündeten Arealen ist ein Hauptcharakteristikum der Entzündungsvorgänge beim Morbus Crohn (Rogler et al. 1998, Schreiber et al. 1998).

Die beschriebenen in *vitro*-Studien arbeiteten mit Zellkulturen von Monozyten aus dem peripheren Blut von MC-Patienten in einer aktiven Erkrankungsphase. Die Ergebnisse dieser *in vitro*-Studien widersprechen jedoch denen, die bei *in vivo*-Studien anhand von Gewebeproben ermittelt werden konnten (Netea et al. 2004). Möglicherweise liegt dieser Diskrepanz die Tatsache zugrunde, dass die Monozyten, die in den *in vitro*-Studien eingesetzt wurden, aufgrund der prolongierten Exposition gegenüber hohen Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen und bakteriellen Produkten bzw. Endotoxinen schon refraktär gegenüber weiteren Stimuli geworden waren (Caradonna L et al. 2000).

Mehrere Hypothesen wurden aufgestellt, zum grossen Teil anhand von Ergebnissen aus Tiermodellen, um die unterschiedlichen Beobachtungen dieser Studien zu erklären und ein Modell zu entwickeln, das diese Beobachtungen kombinieren könnte. Diese Hypothesen lassen sich anhand ihres zugrunde liegenden Konzeptes in sogenannte "loss-of-function"- und in sogenannte "gain-in-function"-Hypothesen einteilen. Bei der "loss-of-function"-Hypothese wird angenommen, dass das mutierte *CARD15*–Gen zur Translation eines insuffizienten NOD2-Proteins führt, das die Anforderungen einer kontrollierten Aktivierung des angeborenen Immunsystems nicht mehr erfüllen kann, und somit die Entzündungsreaktion in der Darmwand nicht mehr limitiert werden kann (Eckmann et al. 2005, Kelsall 2005). Dahingegen wird bei der "gain-in-function"-Hypothese von einer vermehrten direkten Aktivierung von proinflammatorischen Transduktionswegen durch das veränderte NOD2-Protein mit konsekutiver chronischer Entzündungsreaktion ausgegangen, die ebenfalls nicht

mehr kontrolliert werden kann (Eckmann et al. 2005, Kelsall 2005). Hierbei ist ganz wichtig, dass diese Hypothesen sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern wahrscheinlich parallel oder in Kombination Gültigkeit erlangen (Eckmann et al. 2005, Kelsall 2005).

Drei Modelle wurden entwickelt, um den Mechanismus zu erklären, durch den eine chronische Entzündung in der Wand des Intestinaltraktes durch mutierte NOD2-Proteine induziert und aufrechterhalten werden kann (Eckmann et al. 2005).

4.5.1. Insuffiziente Immunabwehr des Epitheliums – erhöhte Permeabilität der Darmwand

Da NOD2 in hohen Konzentrationen in den Paneth'schen Körnerzellen und bei Stimulation durch MDP bzw. im Rahmen einer Entzündung auch in den intestinalen Epithelzellen (IECs) exprimiert wird, wird angenommen, dass das unveränderte NOD2-Protein in diesen Zellen zur unspezifischen Abwehr von luminalen Bakterien dient. Einerseits induziert NOD2 die Synthese und die Sekretion von α-Defensinen in den Paneth'schen Körnerzellen, die luminale und aus dem Lumen in die Enterozyten eindringende Bakterien abtöten können und andererseits auch den NF-κB-Signalweg über die Interaktion von GRIM-19, die zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt (Abbildung 4.5.1.1). Das mutierte NOD2 kann diese Abwehrmechanismen nicht mehr induzieren. Daraus resultiert eine erhöhte Bakterienlast im Lumen und in den IECs sowie eine chronische Entzündungsreaktion der Darmwand (Abbildung 4.5.1.1).

Wildtyp-NOD2

NOD2-Mutante

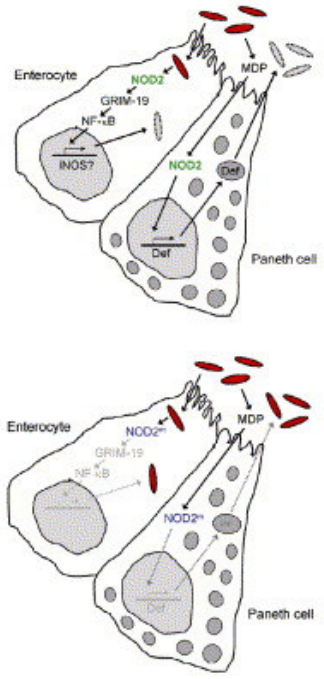


Abbildung 4.5.1.1: Funktion von NOD2 in Enterozyten. Induktion der Synthese und Sekretion von α-Defensinen in den Paneth'schen Zellen und Interaktion mit GRIM-19 in IECs mit Induktion des NF-κB-Signalwegs bzw. Dysfunktion bei mutiertem NOD2 (in Anlehnung an Eckmann et al. 2005).

Durch Transfektion des Wildtyp-*CARD15*-Gens in intestinale Epithelzellen (IECs) konnten Hisamatsu et al. demonstrieren, dass NOD2 das Eindringen von invasiven Bakterien in diese Zellen blockiert und das Wachstum dieser Bakterien in den IECs hemmt (Hisamatsu et al. 2003). Somit kann also angenommen werden, dass NOD2 antimikrobielle Eigenschaften besitzt, wohingegen NOD2-Mutanten, die mit einem Morbus Crohn assoziiert sind, diese Eigenschaften verloren haben (Abbildung 4.5.1).

Dieser Funktionsverlust kann möglicherweise auf die eingeschränkte Fähigkeit des mutierten NOD2 zurückgeführt werden, den NF-κB-Signalweg zu induzieren. Damit verbunden kommt es zu einer verminderten NF-κB-abhängigen Expression und Sekretion von antimikrobiell wirksamen Substanzen wie zum Beispiel β-Defensin 2 oder der induzierbaren NO-Synthetase (Hisamatsu et al. 2003).

Bei „knock-out"-Mäusen, denen das *CARD15*–Gen gänzlich fehlte, war das angeborene Immunsystem unfähig, orale Infektionen mit dem invasiven Erreger *Listeria monocytogenes* abzuwehren. Parallel dazu konnte bei diesen Tieren eine stark verminderte Expression und Sekretion von mindestens zwei antimikrobiell wirksamen Peptiden, Defcr4 und Defcr-rs10, durch die Paneth'schen Zellen nachgewiesen werden (Kobayashi et al. 2005). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass MC-Patienten mit einer *CARD15*-Mutation eine verminderte Expression und Sekretion der α-Defensine HD-5 und HD-6 in den Paneth'schen Zellen aufwiesen (Wehkamp et al. 2004). Der Funktionsverlust des NOD2-Proteins infolge einer *CARD15*-Mutation entspräche somit annähernd einem gänzlichen Fehlen des NOD2-Proteins (Eckmann et al.2005).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Individuen mit einer *CARD15*-Mutation einen Defekt im intestinalen angeborenen Immunsystem aufweisen, der zu einer verminderten Fähigkeit der intestinalen Epithelzellen führt, eine Vermehrung der enterischen Bakterien im Lumen zu limitieren und eine Invasion der IECs durch enterische Bakterien abzuwehren (Eckmann et al. 2005). Eine übermässige Überwucherung des Darmlumens durch enterische Bakterien oder ein Überwiegen von entzündungsfördernden Bakterienarten könnte die Folge sein. Dadurch wird eine chronische Entzündungreaktion der Darmwand provoziert.

Vereinbar mit dieser "loss-of-function"-Hypothese sind Beobachtungen, dass NOD2 konstitutiv in den Paneth'schen Zellen des Dünndarmes im terminalen Ileum exprimiert wird (Lala et al. 2003; Ogura et al. 2003), dass die häufigen Mutationen des *CARD15*–Gens mit einer Lokalisation der Erkrankung im terminalen Ileum assoziiert werden konnten (Economou M et al. 2004), und dass eine antibiotische Therapie zumindest bei MC-Subgruppen einen guten therapeutischen Effekt zeigte (Isaacs et al. 2004).

4.5.2. Dysregulation des Interleukins IL-12

Es wird vermutet, dass das Wildtyp-NOD2-Protein die TLR2-vermittelte Immunantwort von Makrophagen auf eine Stimulation des TLR2–Rezeptors durch Peptidoglycan (PGN) hemmt. Dagegen scheint das mutierte NOD2-Protein diese Immunantwort der Makrophagen nicht limitieren zu können. Folglich kommt es zu einer erhöhten Aktivierung von NF-κB und zu einer erhöhten Expression speziell von c-Rel, einer Untereinheit von NF-κB und IL-12-p35. Eine erhöhte Sekretion von IL-12 stimuliert wiederum das Wachstum und die Differenzierung von Th1-Zellen, verbunden mit einer IFN-γ-vermittelten Entzündungsreaktion der Darmwand (Abbildung 4.5.2.1).

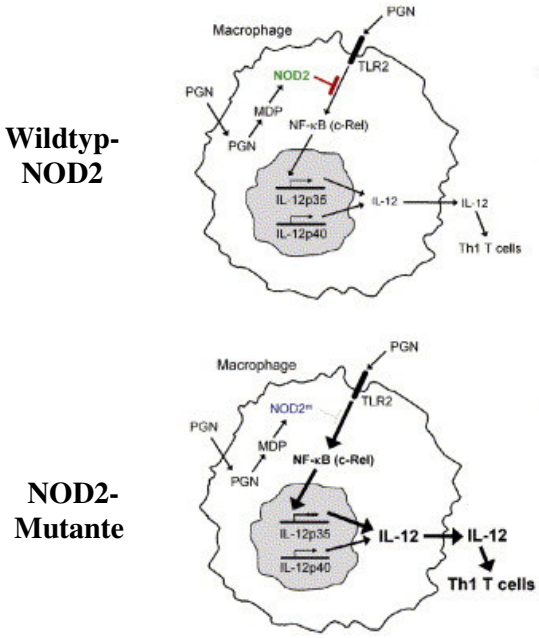


Abbildung 4.5.2.1: Interaktion von NOD2 mit dem TLR2-Rezeptor: Hemmung von TLR2 durch das Wildtyp-NOD2-Protein und Dysfunktion bei mutiertem NOD2 (in Anlehnung an Eckmann et al. 2005).

Watanabe et al. untersuchten in Makrophagen der Milz murinen Ursprungs unter anderem mögliche Auswirkungen eines Funktionsverlustes von NOD2 auf die Expression und Sekretion des proinflammatorisch wirksamen IL-12 (Watanabe et al. 2004). Dabei wurden Makrophagen von *CARD15*-Wildtyp-Mäusen mit Makrophagen von "knock-out" Mäusen (*CARD15*-/-) und

Makrophagen von Mäusen mit einem mutierten *CARD15*–Gen verglichen. In dieser Studie konnte demonstriert werden, dass eine Funktionsminderung oder ein Funktionsverlust von NOD2 die Sekretion von IL-12 in Makrophagen erhöht. Normalerweise hemmt das funktionsfähige NOD2 die Sekretion von IL-12 durch eine antagonistische Hemmung des TLR2-Rezeptors, der als transmembranöser Rezeptor in der Zellmembran von Makrophagen die Sekretion von IL-12 nach Stimulation durch MDP fördert (Abbildung 4.5.2.1).

In diesem Modell wird also von einem Verlust des antagonistischen Potentials von NOD2 auf den TLR2-Rezeptor ausgegangen, der in einer erhöhten IL-12-Synthese mündet. Nach Sekretion stimuliert IL-12 die IFN-γ-Produktion durch T-Zellen und NK-Zellen sowie das Wachstum und die Differenzierung von T-Zellen vom Th1-Typ, beides verbunden mit einer Entzündungsreaktion der Darmwand (Watanabe et al. 2004).

Den Th1-T-Zellen wird wiederum eine grosse Bedeutung in der Pathogenese des Morbus Crohn zugeschrieben (Bouma et al. 2003). Auch der Erfolg einer Therapie mit IL-12-Antikörpern bei MC-Patienten stüzt dieses Modell des Funktionsverlusts von NOD2 (Mannon et al. 2004).

Allerdings beobachtete eine andere Arbeitsgruppe um Kobayashi et al. keine erhöhte Sekretion von IL-12 in Makrophagen von *CARD15*-mutierten Mäusen bei Stimulation der Makrophagen mit PGN (Kobayashi et al. 2005). Möglicherweise sind ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund der Mausstämme und Unterschiede im Studiendesign für diese Diskrepanz verantwortlich (Eckmann et al. 2005).

4.5.3. Vermehrte Synthese und Sekretion von IL-1β

Das dritte Modell geht von einem "gain-in-function" des mutierten NOD2 aus. Nur das mutierte NOD2, nicht der NOD2-Wildtyp, ist dabei in der Lage, das sogenannte "IL-1β-converting enzyme" (ICE/caspase-1) zu aktivieren. ICE katalysiert die Umwandlung einer Vorstufe von IL-1β, pro IL-1β, in das aktive, 17 kDa große IL-1β, das von Makrophagen sezerniert wird. IL-1β aktiviert wiederum in einer autokrinen und parakrinen Weise ein breites Spektrum an proinflammatorischen Genen und trägt damit zu einer chronischen Entzündungsreaktion im Intestinaltrakt bei (Abbildung 4.5.3.1). Zusätzlich

scheinen die MC-assoziierten *CARD15*–Mutationen potentere Aktivatoren von RIP2 und von NF-κB zu sein. Dies führt zu einer überschiessenden Entzündungsreaktion in der Darmwand mit chronifizierendem Charakter.

Wildtyp-NOD2

NOD2-Mutante

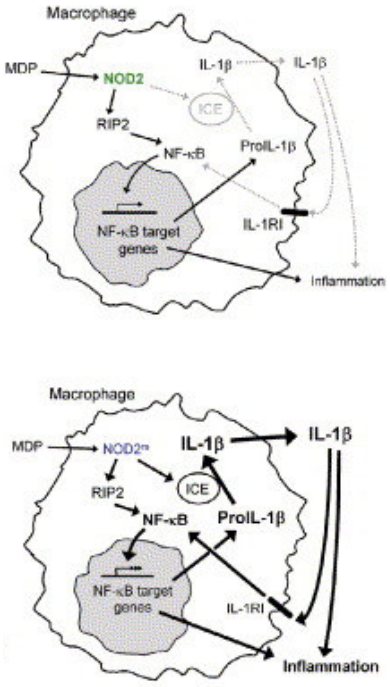


Abbildung 4.5.3.1: "Gain-in-function" des mutierten NOD2 durch direkte Aktivierung des "IL-1β-converting enzyme" (ICE) und damit vermehrte Synthese von IL-1β und Induktion von verschiedenen proinflammatorischen Genen durch IL-1β (in Anlehnung an Eckmann et al.2005).

Klinische Studien, darunter auch unsere, konnten eindrücklich zeigen, dass die Insertionsmutation c.3020insC mit dem höchsten Risiko verbunden ist, an einem Morbus Crohn mit einem schweren Krankheitsverlauf und vielen Komplikationen zu erkranken (Lesage et al. 2002, Cuthbert et al. 2002, Lakatos et al. 2005, Vavassori et al. 2004, Annese et al. 2004, Radlmayr et al. 2002). Eine Arbeitsgruppe unter Maeda et al. züchtete "knock-in"-Mäuse, deren murines *card15*–Gen analog zum humanen *CARD15*–Gen durch die Insertionsmutation c.3020insC verändert war. Die Insertionsmutation wurde dabei als Nod22939iC bezeichnet (Maeda et al. 2005). Im Gegensatz zum Verlust der Erkennung von MDP und der Immunantwort nach Stimulation mit MDP bei "knock-out"-

Mäusen mit fehlendem *CARD15*–Gen wurde bei den "knock-in"-Mäusen mit einer Homozytogie für die Insertionsmutation Nod22939iC eine verstärkte Aktivierung von NF-κB nach Stimulation mit MDP beobachtet (Maeda et al. 2005). Auch wurde bei diesen Mäusen eine Hochregulierung von verschiedensten Zielgenen des NF-κB-Signalwegs einschliesslich IL-6, IL-1β und Cox-2 beobachtet. Nach Exposition der "knock-in"-Mäuse gegenüber DSS ("dextran sodium sulfate") wurde bei diesen Tieren eine sehr aktive und aggressive Form der Colitis induziert, die zudem durch eine erhöhte Synthese und Sekretion von aktivem IL-1β charakterisiert war, das zudem proinflammatorisch wirkte (Maeda et al. 2005).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass das NOD2-Protein, das in diesen "knock-in"-Mäusen exprimiert wird, die Umwandlung der inaktiven Vorstufe von IL-1β, proIL-1β, in die reife, biologisch aktive Form IL-1β fördert (Abbildung 4.5.3.1) (Maeda et al. 2005). Betrachtet man die zentrale Stellung des "IL-1β-converting enzyme" (ICE) bei diesem Prozess, so kann angenommen werden, das das veränderte NOD2-Protein nach Induktion durch MDP das ICE entweder direkt oder indirekt aktivieren kann (Maeda et al. 2005).

Somit sprechen die Ergebnisse dafür, dass es sich bei der murinen c.2939iC-Mutation und der humanen c.3020insC-Mutation um "gain-in-function"-Mutationen handeln könnte (Abreu 2005). Eine erhöhte Sekretion von IL-1β kann nachfolgend eine Expression von vielen unterschiedlichen proinflammatorisch wirksamen Zytokinen und zudem eine autokrine oder parakrine Freisetzung von Mediatoren zur Folge haben, die in einer sich verstärkenden und chronifizierenden Entzündungsreaktion des Intestinaltraktes resultiert (Eckmann et al. 2005).

Eine Assoziation von *CARD15*–Mutationen mit einem Morbus Crohn wurde durch zahlreiche Studien in verschiedenen europäischen Bevölkerungsgruppen demonstriert und zudem durch eine Metaanalyse bestätigt (Economou et al. 2004). Viele Hyothesen wurden seitdem aufgestellt, um diese Assoziation zu erklären. Sicherlich stellen *in vivo*-Studien wie die hier erwähnten Mausmodelle einen wichtigen Schritt dar, um die Bedeutung der *CARD15*–Mutationen für die Pathophysiologie des Morbus Crohn genauer zu definieren. Die Gültigkeit der Bobachtungen aus *in vitro*-Studien an Zellen, wie sie zum Beispiel Ogura et al. im Jahre 2001 oder Chamaillard et al. im Jahre 2003 publizierten, muss angesichts der Mausmodellstudien dagegen kritisch beurteilt werden, da sich die damit

gewonnenen Erkenntnisse möglicherweise nicht auf den menschlichen Organismus übertragen lassen (Ogura et al. 2001b, Chamaillard et al. 2003a).

Um die Hypothesen und Vorhersagen, die anhand von Studien an Mausmodellen aufgestellt wurden, letztendlich auf den Menschen übertragen zu können, müssen darüberhinaus Studien mit humanen Zellen und humanem Gewebe von CED-Patienten und gesunden Kontrollpersonen durchgeführt werden. CED-Patienten mit dem *CARD15*-Wildtyp müssen zudem mit Trägern von *CARD15*-Mutationen verglichen werden. Von klinischer Seite wäre es sicherlich sehr interessant, insbesondere die Beziehung zwischen dem *CARD15*-Mutationsstatus und dem Ansprechen auf eine antibiotische Therapie genauer zu betrachten. Vielleicht wären damit neue Einblicke möglich, welche Rolle enterische Bakterien als ständiger Stimulus einer sich selbst unterhaltenden chronischen Inflammation des Intestinaltraktes spielen.

4.6. Weitere Suszeptibilitätsgene, die mit einer Prädisposition für eine CED assoziiert sind

Bei weit weniger als der Hälfte der 303 MC-Patienten (39.6 %) unserer Kohorte von 445 CED-Patienten kaukasischer Abstammung waren die beiden *CARD15*-Allele durch mindestens eine der drei Hauptmutationen des *CARD15*-Gens verändert. Bei einem durchschnittlichen Anteil von 35-45 %, der auch in zahlreichen anderen europäischen Studien bei MC-Patienten kaukasischer Abstammung beobachtet wurde, bedeutet dies, dass ungefähr 55-65 % der MC-Patienten keine dieser Mutationen aufweisen (Abreu et al. 2002b, Ahmad et al. 2002, Cavanaugh et al. 2003, Cuthbert et al. 2002, Esters et al. 2004, Mendoza et al. 2003, Roussomoustakaki et al. 2003, Vermeire et al. 2002b, Helio et al. 2003, Bairead et al. 2003, Arnott et al. 2004, Lesage et al. 2002, Lakatos et al. 2005, Annese et al. 2004). Demzufolge müssen bei diesen Patienten Veränderungen anderer Suszeptibilitätsgene für die genetische Prädisposition verantwortlich gemacht werden, da nur etwa 20 % der genetischen Prädisposition durch *CARD15*-Mutationen erklärt werden kann (Vermeire et al. 2005). Seit der Erstbeschreibung des *CARD15*-Gens wurden durch die Kandidatengen-Analyse und durch detailliertere Untersuchungen von CED–assoziierten Regionen des menschlichen Genoms weitere Gene bzw. Genveränderungen beschrieben, die neben *CARD15* als weitere genetische Faktoren in der

Pathophysiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielen könnten (Vermeire et al. 2005, Silverberg et al. 2005). *DLG5*, *SCL22A4* und *SLC22A5*, Gene der HLA-Region, *CARD4* und *TLR4* sind solche potentiellen Suszeptibilitätsgene.

4.6.1. Das *DLG5*-Gen

Im Rahmen einer von Stoll et al. durchgeführten Studie wurde auf dem Chromosom 10 in der Region 10q23, der ursprünglich durch Hampe et al. mit den CED assoziiert werden konnte, das sogenannte *DLG5*-Gen identifiziert (DLG steht für das homologe Gen der *Drosophila toll*, "Drosophila discs large homologue 5") (Stoll et al. 2004, Hampe et al. 1999a). Zwei Haplotypen des *DLG5*-Gens (G113A und DLG_e25) konnten dabei mit den CED assoziiert werden. In einer zweiten Studie wurden diese Daten nur teilweise bestätigt (Daly et al. 2005), während in anderen Studien (darunter auch eine einer Münchner Arbeitsgruppe) eine solche Assoziation nicht mehr repliziert werden konnte (Noble et al. 2005, Török et al. 2005).

4.6.2. Das *SCL22A4*- und das *SLC22A5*-Gen

Zwei weitere Kandidatengene, *SCL22A4* und *SLC22A5*, konnten im IBD5-Lokus auf Chromosom 5 im Bereich 5q31-33 identifiziert werden. *SCL22A4* codiert für das OCTN1- und *SLC22A5* für das OCTN2-Protein ("novel organic cation transporter") (Peltekova et al. 2004). Eine Assoziation zwischen dem IBD 5-Lokus und einem Morbus Crohn wurde als erstes in einer Kanadischen Patientenkohorte beschrieben (Rioux et al. 2000). Mindestens drei Arbeitsgruppen konnten nachfolgend voneinander unabhängig eine Assoziation zwischen dem IBD5-Risikohaplotyp und dem Morbus Crohn (Giallourakis et al. 2003, Negoro et al. 2003, Mirza et al. 2003; McGovern et al. 2003) und auch der Colitis ulcerosa (Giallourakis et al. 2003, Mirza et al. 2003) zeigen. Durch die Sequenzierung der fünf bekannten Gene der IBD5-Region konnten Peltekova et al. 10 neue Nukleotidaustausche detektieren. Jeweils eine Veränderung wurde dabei im *SCL22A4*-Gen (C→T-Nukleotidaustausch in Exon 9) und im *SLC22A5*-Gen (G→C-Substitution in der Promoter-Region)

identifiziert, die zusammen den sogenannten TC-Haplotyp bilden, der mit einem Morbus Crohn assoziiert werden konnte (Peltekova et al. 2004). Peltekova et al. konnten zudem zeigen, dass dieser TC-Haplotyp ebenfalls mit den *CARD15*-Genveränderungen assoziiert ist. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation, die ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, zeigte eine Assoziation zwischen einer Homozygotie für den TC-Haplotyp und einem Befall des terminalen Ileums, insbesondere bei gleichzeitigem Vorhandensein von *CARD15*-Mutationen (Newman B et al. 2005a).

4.6.3. Gene der HLA-Region

In der MHC ("major histocompatibility complex")-Region wurde sicherlich am intensivsten mit der Methodik der Kandidatengenanalyse nach krankheitsassoziierten Genen gesucht. HLA II ("human leukocyte antigens")-Moleküle spielen bei der Antigenpräsentation von partiell prozessierten Antigenen im Rahmen der T-Zell-vermittelten Immunantwort eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu anderen chronischen Erkrankungen mit immunologischer Basis wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, der Multiplen Sklerose und dem Diabetes mellitus, bei deren Pathophysiologie der MHC-Komplex eine entscheidende Rolle spielt, ist die Bedeutung des MHC in der Entstehung der CED nicht eindeutig geklärt. Durch die aus Studien gewonnenen Ergebnisse können diese Assoziationen nur sehr vage und unzureichend definiert werden (Futami et al. 1995, Yoshitake et al. 1999, Danze et al. 1996, Satsangi J et al. 1996a, Stokkers et al. 1999). HLA DR2 (DRB1*1502) konnte beispielsweise im Rahmen von japanischen Studien mit der Colitis ulcerosa assoziiert werden (Futami et al. 1995, Yoshitake et al. 1999), während in Europa HLA DR3 (DRB1*0103) bei der Pathophysiologie der Colitis ulcerosa eine Rolle spielen könnte (Danze et al. 1996, Satsangi et al. 1996). Im Falle des Morbus Crohn ist die Assoziation zwischen HLA-Genen und der Erkrankung noch weniger überzeugend. So konnte HLA DR1 mit dem Morbus Crohn in Verbindung gebracht werden (Stokkers et al. 1999).

4.6.4. Das *TLR4*-Gen

Nach Identifizierung des *CARD15*-Gens und der Beschreibung der Rolle von NOD2 im angeborenen Immunsystem bei der Erkennung von luminalen Bakterien wurde speziell nach Veränderungen in Genen von "pattern recognition receptors" (PRRs) oder auch "pattern recognition molecules" (PRMs) gesucht, die deren Funktion beeinflussen könnten. So wurden neben den Genen der intrazytosolisch gelegenen NOD-Rezeptoren auch die Gene von transmembranös lokalisierten PRRs, den "Toll-like receptors" (TLRs), auf Veränderungen hin untersucht. Der TLR4-Rezeptor wird u. a. auf intestinalen epithelialen Zellen (IECs) exprimiert und spielt bei der Erkennung von LPS durch Gram-negative Bakterien des Lumens eine Rolle (Cario 2005). Ein Polymorphismus im TLR4-Gen, der für den Austausch p.Asp299Gly kodiert, konnte mit einer reduzierten Immunantwort des Bronchialsystems beim Menschen assoziiert werden und führte bei Transfektionsexperimenten zu einer geringeren Aktivierung von TLR4, ähnlich wie einige der beschriebenen *CARD15*-Mutationen (Arbour et al. 2000). Der p.Asp299Gly-Polymorphismus konnte im Rahmen einer belgischen Studie zudem mit dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa (Franchimont et al. 2004) und mit dem Morbus Crohn in Patientenkohorten aus Griechenland und den Niederlanden assoziiert werden (Ouburg et al. 2005, Gazouli et al. 2005). Eine Studie unserer Arbeitsgruppe konnte diese Ergebnisse ebenfalls bestätigen und eine mögliche Assoziation des p.Asp299Gly-Polymorphismus mit einem speziellen Phänotyp der Erkrankung aufzeigen (Brand, Staudinger, Schnitzler et al. 2005). Eine weitere Studie aus München konnte eine Assoziation zwischen einem weiteren Polymorphismus des TLR4, p.Thr399Ile, und der Colitis ulcerosa demonstieren (Török et al. 2004). Allerdings konnte in anderen Patientenpopulationen aus Deutschland, Ungarn und Schottland keine Assoziation des p.Asp299Gly-Polymorphismus mit einer CED nachgewiesen werden (Török et al. 2004, Lakatos et al. 2005, Arnott et al. 2004). Ob es sich bei diesen beiden Polymorphismen tatsächlich um die eigentlichen krankheitsverursachenden Veränderungen des TLR4-Rezeptors handelt oder ob ihr Auftreten möglicherweise einfach nur mit dem Vorhandensein anderer krankheitsverursachender *TLR4*-Genveränderungen gekoppelt ist, wie neuere Studien suggerieren, konnte bis jetzt noch nicht eindeutig geklärt werden (Oostenbrug et al. 2005).

4.6.5. Das *CARD4*-Gen

NOD1 ist im Aufbau dem NOD2-Protein sehr ähnlich und gehört wie NOD2 zu den intrazytosolisch gelegenen Toxinrezeporten („PPRs“). Anders als NOD2 hat NOD1 eine hohe Affinität zu γ-D-glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), die ebenfalls in PGN enthalten ist, aber nur in PGN von Gram-negativen Bakterien (Girardin et al. 2003b, Chamaillard et al. 2003b). Analog zu NOD2 wäre also auch für NOD1 zu erwarten, dass Mutationen im *CARD4*-Gen ähnliche Auswirkungen auf die NOD1-Proteinfunktion haben wie die Veränderungen des *CARD15*-Gens beim NOD2-Protein.

Vor kurzem wurde eine komplexe Insertions-/Deletionsmutation (ND(1) + 32656*1) im *CARD4*-Gen beschrieben, die im Rahmen einer Studie aus Oxford streng mit den CED assoziiert war (McGovern et al. 2005). *CARD4* liegt auf Chromosom 7 im Bereich 7p14, der zuvor im Rahmen einer Kopplungsstudie der gleichen Arbeitsgruppe mit den CED assoziiert werden konnte (Satsangi J et al. 1996b). Interessanterweise wurde dieses Gen schon zuvor von einer französischen Arbeitsgruppe um Hugot et al. untersucht, wobei keine Assoziation zwischen Veränderungen dieses Gens und einem Morbus Crohn gefunden werden konnte (Zouali H et al. 2003). Weitere Studien sind zur Klärung dieser Diskrepanz notwendig.

4.6.6. Andere Suszeptibilitätsgene

Es ist schon fast selbsterklärend, dass auch in Zukunft durch die detaillierte Untersuchung anderer beschriebener Genloci, die durch Assoziationsstudien im menschlichen Genom ermittelt werden konnten, weitere Suszeptibilitätsgene identifiziert werden, die möglicherweise ebenfalls für eine CED prädisponieren. Analog zu *CARD15*/NOD2 könnten diese Varianten populationsspezifisch und mit einem spezifischen Phänotyp der Erkrankung assoziiert sein. Die Studien werden sich ebenfalls wahrscheinlich verändern, weg von den initial durchgeführten grossen Screeningstudien des gesamten Genoms hin zu detaillierteren Untersuchungen, dem "finemapping" der einzelnen Loci, das zur Identifizierung weiterer potentieller Kandidatengene führen könnte, die in der Pathophysiologie der CED eine Rolle spielen.

4.7. *CARD15*/NOD2 im klinischen Alltag: Nutzen für Diagnostik und Therapie einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung

Seit der Erstbeschreibung von *CARD15*/NOD2 im Jahre 2001 wurden zahlreiche Studien durchgeführt, die untersuchten, welche Folgen die Veränderungen des *CARD15*-Gens für die Krankheitsentstehung und für den Krankheitsverlauf eines Morbus Crohn haben. Hauptziel einiger Studien und auch der unserigen war es, diese Ergebnisse bzw. Beobachtungen für den Kliniker nutzbar zu machen und eventuell die Genotypisierung als weiteres diagnostisches Werkzeug neben den schon bestehenden Möglichkeiten wie zum Beispiel der Endoskopie, der Radiologie, der Histologie und serologischen Markern zusätzlich einzusetzen. Damit könnte möglicherweise dem Kliniker die Diagnosestellung einer CED bzw. die Differentialdiagnose zwischen dem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa erleichtert werden. Auch hinsichtlich des Krankheitsverlaufs könnten dem Kliniker bei Kenntnis des *CARD15*-Mutationsstatus des MC-Patienten neue Möglichkeiten in der frühzeitigen Planung der Therapie des Morbus Crohn eröffnet werden. Generell könnten also mehrere Fragen durch eine Kenntnis des Genotyps des Patienten beantwortet werden, die für den klinischen Alltag eine Relevanz haben.

4.7.1. Der *CARD15*-Mutationsstatus bei Patienten mit Morbus Crohn – Vorhersage des Schweregrades der Erkrankung und des Krankheitsverlaufs

Bei Patienten mit bereits sicher diagnostiziertem Morbus Crohn kann der *CARD15*-Genotyp als zusätzlicher Bewertungsfaktor verwendet werden. Eine Vorhersage über den Schweregrad der Erkrankung und den Krankheitsverlauf könnte dem Kliniker helfen, bei genetisch definierten Subgruppen von MC-Patienten mit dem gleichem Phänotyp eine frühzeitige Therapie zu planen und diese für den speziellen Genotyp und den damit assoziierten Phänotyp zu optimieren. Ziel unserer Studien war es, die MC-Patienten unserer CED-Kohorte in homogene Subgruppen zu unterteilen, die sich in ihrem Befallsmuster, dem Krankheitsverlauf und den entstehenden Komplikationen im Verlaufe der Erkrankung ähneln, um dann möglicherweise eine einheitliche Therapieplanung dieser

Patienten entwickeln zu können. Patienten mit einer Homozytogie für die Insertionsmutation c.3020insC in Exon 11 des *CARD15*-Gens bildeten genau solch eine Subgruppe von MC-Patienten, die wir aufgrund des schweren Krankheitsverlaufs als Hochrisikogruppe einstuften. Bei Betrachtung der Ergebnisse unserer Studien scheint eine Genotypisierung speziell von MC-Patienten sehr sinnvoll, die bereits in jungen Jahren an einem Morbus Crohn, vorzugsweise im terminalen Ileum, erkranken und einen raschen und progressiven Krankheitsverlauf zeigen. Da es initial nach Diagnosestellung wenig aussagekräftige Vorhersagewerte über den weiteren Verlauf der Erkrankung gibt, könnte die Ermittlung des *CARD15*-Mutationsstatus gerade in dieser Anfangsphase helfen, solche Hochrisikopatienten zu identifizieren und sie frühzeitig einer optimalen Therapie zuzuführen. Eine rasche Initiierung einer Immunsuppression könnte den Krankheitsverlauf bei diesen Hochrisikopatienten möglicherweise mildern mit dem Ziel, die gerade bei diesen Patienten auftretenden Komplikationen zu minimieren. Von besonderer Priorität ist dabei sicherlich eine Vermeidung der operativen Intervention, die aufgrund von Komplikationen in unserer Hochrisikogruppe bei 73.7 % der Patienten indiziert war, teilweise mit der Notwendigkeit von multiplen operativen Eingriffen. Auch eine weitere Studie aus München konnte eine Assoziation zwischen *CARD15*-Mutationen und der Notwendigkeit einer Ileozökalresektion bei MC-Patienten zeigen (Radlmayr M et al. 2002). Eine frühzeitige Identifizierung solch genetisch determinierter Hochrisiko-Patienten könnte bei diesen eine Wende von der operativen Therapie hin zu einer konservativen Therapie bedeuten, die möglicherweise mit einer erheblichen Verbesserung der Lebensqualität einhergeht.

4.7.2. Der *CARD15*-Mutationsstatus bei Patienten mit „indeterminierter Colitis“

Trotz zahlreicher Systeme zur Klassifizierung der CED und der zahlreichen Befunde aus klinischen, radiologischen, endoskopischen und histopathologischen Untersuchungen ist eine Differenzierung zwischen einem Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa oft sehr schwierig. Bei durchschnittlich 10 % der Patienten mit einer chronischen Entzündung des Colons kann die Erkrankung daher nicht eindeutig dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa zugeordnet werden. Bei diesen Patienten wird

die chronische Entzündungsreaktion deshalb als „indeterminierte Colitis“ (IC) eingestuft. Epidemiologische Studien aus Skandinavien zeigten, dass bei 5-23 % aller initialen Diagnosen, die bei Patienten mit einer chronischen Inflammation des Darmes gestellt wurden, von einer „indeterminierten Colitis“ ausgegangen wurde (Lee et al. 1979, Hildebrand et al. 1991, Moum et al. 1997, Ekbom 2000; Geboes et al. 2003; Guindi et al. 2004; Hale et al. 2004; Hildebrand et al. 2003, Stewenius et al. 1995). Die Inzidenz der IC lag bei 2.4 pro 100.000 Personen. In der Regel handelt es sich um eine temporäre Diagnose. Bei bis zu 80 % dieser Patienten wird im Laufe der Erkrankung ein Morbus Crohn oder eine Colitis ulcerosa diagnostiziert (Vermeire 2004a). Eine genaue Differenzierung zwischen diesen beiden Formen ist aber sehr wichtig. Bei Patienten mit einer IC wird mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Colektomie durchgeführt werden müssen, und die Insuffizienzraten des angelegten Pouches sind bei IC-Patienten zudem viel höher als bei Patienten mit einer eindeutig diagnostizierten Colitis ulcerosa. Auch ist die Prognose der „indeterminierten Colitis“ schlechter als die einer Colitis ulcerosa. Bei IC-Patienten wurde eine höhere Rezidivrate und ein höheres Risiko, ein colorektales Karzinom zu entwickeln, beobachtet.

Bis jetzt konnten nur sehr wenige Faktoren beschrieben werden, mit denen eine definitive Diagnose einer „indeterminierten Colitis“ möglich wäre. Eine belgische Studie konnte zeigen, dass Antikörper gegen *Saccharomyces cerevisae* (ASCA) und antineutrophile zytoplasmatische Antikörper mit perinukleärem Floureszenzmuster (p-ANCA) helfen könnten, den Phänotyp der IC-Patienten genauer zu definieren (Joossens et al. 2002). Eine weitere belgisch-österreichische Studie untersuchte den Nutzen der Kenntnis des *CARD15*-Genotyps des IC-Patienten für die definitive Diagnosestellung eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa (Vermeire et al. 2002a). Die Daten zeigten, dass *CARD15*-Mutationen keine zusätzliche Information liefern, um die IC-Patienten besser zu klassifizieren. Aufgrund der geringen Anzahl der IC-Patienten in unseren Studien (n = 15 von 445 CED-Patienten; 3.4 %) lassen sich ebenfalls keine Aussagen treffen. Weitere prospektive Studien sind notwendig, um die Bedeutung des *CARD15*-Genotyps für die definitive Diagnosestellung bei IC-Patienten zu klären.

4.7.3. Der *CARD15*-Mutationsstatus als prognostischer Parameter für das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie

Mit der Entwicklung sogenannter „Biologika“ wurden in der Therapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen neue Möglichkeiten geschaffen, um die chronische Entzündungsreaktion einzudämmen, speziell, wenn herkömmliche Therapien unwirksam werden oder die Nebenwirkungen dieser Medikamente den therapeutischen Nutzen nicht mehr rechtfertigen können. Die ersten Biologika in Form von Antikörpern kamen Mitte der 90er Jahre auf den Markt. 1998 wurde ein chimärer Antikörper gegen den Tumornekrosefaktor α (TNF-α) zugelassen. Infliximab (Remicade) und auch die meisten anderen neuen Biologika werden als Reservetherapeutikum bei schweren Krankheitsverläufen eingesetzt, bei denen die herkömmlichen Standardtherapien der CED wirkungslos sind. Allerdings profitieren nicht alle Patienten von diesen neuen Medikamenten, einige sind sogar therapierefraktär. Im Falle des Infliximab haben randomisierte, Plazebo-kontrollierte Studien eine Ansprechrate von 75-80 % bei CED-Patienten gezeigt (Targan et al. 1997, Rutgeerts et al. 1999, Present et al. 1999, Hanauer et al. 2002, Sands et al. 2004, Rutgeerts et al. 2005, Sandborn et al. 2005). Die Ursachen, die bei etwa 20-25 % zu einem Nichtansprechen der Infliximab-Therapie führen, konnten bis jetzt noch nicht geklärt werden. Aufgrund der zentralen Rolle, die TNF-α in der Pathophysiologie der CED und auch im Wirkungsmechanismus von Infliximab spielt, wurden entsprechend die Gene untersucht, die für TNF-α und den TNF-α-Rezeptor kodieren. Zahlreiche Veränderungen wurden beschrieben, konnten aber nicht mit dem Ansprechen oder Nichtansprechen einer medikamentösen Therapie mit Infliximab assoziiert werden (Mascheretti et al. 2002a).

CARD15-Mutationen konnten mit einer erhöhten Aktivierung von NF-κB und einer daraus resultierenden erhöhten Produktion von TNF-α assoziiert werden. Deshalb wurde angenommen, dass diese vielleicht auch bei dem Therapieansprechen auf Infliximab eine Rolle spielen könnten, der ja spezifisch TNF-α blockiert. Allerdings konnten zwei unabhängig voneinander arbeitende Arbeitsgruppen aus Belgien und Deutschland keine Assoziation zwischen *CARD15*-Mutationen und dem Therapieerfolg von Infliximab zeigen (Vermeire et al. 2002c, Mascheretti et al. 2002b).

Betrachtet man das NOD2-Protein als intrazytosolischer Rezeptor des angeborenen Immunsystems, der in der Erkennung und Abwehr von Gram-negativen Bakterien im Darmsystem eine wichtige Rolle spielt, so stellt NOD2 einen vielleicht entscheidenden Knotenpunkt zwischen den luminalen Bakterien und der chronischen Inflammation der Darmwand dar. Somit könnten vielleicht *CARD15*-Mutationen als Prädiktoren eines Ansprechens anderer Therapien wie zum Beispiel der mit Antibiotika dienen. Studien werden dies sicherlich in naher Zukunft näher untersuchen.

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien durchgeführt, um die Bedeutung genetischer Faktoren in der Pathophysiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen genauer zu erforschen. Bis jetzt wurden mehr als 10 Regionen des menschlichen Genoms identifiziert, die mit der Erkrankung assoziiert werden konnten. Die Untersuchungen der Konsequenzen von Genveränderungen in verschiedensten sogenannten Suszeptibilitätsgenen, die in der Entstehung der CED eine Rolle spielen könnten wie zum Beispiel *CARD15*, *CARD4*, *SCL22A4* und *SLC22A5*, *DLG5*, *TLR4* und die HLA-Gene, haben völlig neue Einblicke in die Pathobiologie der CED ermöglicht. Sie verdeutlichen die Bedeutung des Zusammenspiels von genetischen Faktoren, dem angeborenen Immunsystem und den Antigenen der luminalen Bakterien.

Zahlreiche Studien untersuchten dabei die Einflüsse der Genetik bei der Erkennung von bakteriellen Antigenen durch die intrazytosolischen Rezeptoren NOD1 und NOD2 sowie bei der extrazytosolischen Toxinerkennung durch die "Toll-like"-Rezeptoren (TLRs). Auch Untersuchungen genetischer Einflüsse auf das Prozessieren von Antigenen (HLA-Moleküle) oder die Organisation des intestinalen Epithels (*DLG5*) verdeutlichen, welche Bedeutung genetische Varianten in der Pathophysiologie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen haben. Die Beobachtungen dieser Studien liefern immer mehr Beweise für die Hypothese einer multifaktoriellen Ursache der Entstehung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. Der wahrscheinlich durch mehrere Veränderungen in verschiedenen Genen prädisponierte Organismus reagiert dabei mit einer abnormalen, exzessiv erhöhten Immunantwort auf einen Stimulus der Umwelt, der sehr wahrscheinlich Antigenen der normalen intestinalen luminalen Bakterienflora entspricht.

Bei der Assoziation der *CARD15*-Mutationen mit dem Morbus Crohn, wie sie auch in den beiden hier vorgestellten Studien nachgewiesen werden konnte, handelt es sich zweifelsohne um die am besten und in zahlreichen Studien auch am häufigsten reproduzierbare Assoziation zwischen der Veränderung in einem Suszeptibilitätsgen und der Erkrankung. Diese Beobachtung und auch die Tatsache, dass verschiedene *CARD15*-Varianten in einigen früher durchgeführten Studien mit einem bestimmten Phänotyp des Morbus Crohn und einem bestimmten Verlauf der Erkrankung korreliert

werden konnten, veranlasste uns zur Durchführung dieser beiden Studien. Ziel war es, diese Beobachtungen für den Kliniker als weitere diagnostische Möglichkeit und vielleicht auch für die Therapieplanung nutzbar zu machen. Wichtig für den Kliniker ist es, frühzeitig Patienten mit einem schweren Krankheitsverlauf der CED, der mit vielen Komplikationen verbunden ist, zu identifizieren, da gerade diese Patienten von einer früh einsetzenden Therapie profitieren, um den Krankheitsverlauf der CED zu mildern und das Auftreten von Komplikationen zu minimieren. Da speziell homozygote und zusammengesetzt heterozygote Träger von *CARD15*-Mutationen von solch einem schweren Krankheitsbild betroffen sind, lag das Hauptinteresse dieser Studien in der Identifikation solcher Subgruppen von genetisch determinierten Hochrisiko-Patienten. Durch die im Rahmen der ersten Studie durchgeführte Untersuchung der drei Hauptmutationen des *CARD15*-Gens (p.R702W kodiert von Exon 4, p.G908R kodiert von Exon 8 und p.1007fs in Exon 11) bei 445 CED-Patienten und der anschließend durchgeführten Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnte solch eine Population von Hochrisiko-MC-Patienten identifiziert werden, die für die Insertionsmutation p.1007fs homozygot waren. Dabei handelt es sich um die größte je in der Literatur veröffentlichte Subkohorte an MC-Patienten (n = 19) mit diesem Genotyp, die durch ein sehr homogenes Krankheitsbild charakterisiert ist. Alle Patienten litten unter einem progressiv verlaufenden Morbus Crohn mit der sehr häufigen Notwendigkeit einer operativen Intervention und des Einsatzes von Immunsuppressiva, um eine Remission der Erkrankung zu erreichen. Auch in der zweiten Studie wurde eine Subgruppe von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen vorgestellt, die unter einer raschen Progression der Erkrankung litt. In dieser Studie sollten zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger identifiziert werden, da dieser Genotyp ebenfalls mit einem schweren Krankheitsbild assoziiert ist. Durch eine limitierte DNA-Sequenzanalyse der Exons 4, 5, 6, 8 und 11 des insgesamt 12 Exons umfassenden *CARD15*-Gens bei 111 CED-Patienten konnten auch seltenere Mutationen detektiert werden. Durch die hier angewendete Detektionsstrategie war es theoretisch möglich, bis zu 96,6 % der bis dahin beschriebenen mutierten Allele effektiv zu identifizieren. Von den acht neuen *CARD15*-Varianten, die im Rahmen dieser Studie identifiziert werden konnten, spielt die Mehrheit wahrscheinlich eine Rolle in der Pathophysiologie der CED. Die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zeigte ein schweres Krankheitsbild bei diesen Patienten und hier insbesondere bei den

zusammengesetzt heterozygoten Merkmalsträgern für eine neue Variante in Kombination mit einer der drei Hauptmutationen.

Trotz kontroverser Diskussionen über den wirklichen Nutzen und die Konsequenzen der Kenntnis des *CARD15*-Mutationsstatus eines CED-Patienten im klinischen Alltag, d. h. für die Diagnostik und eventuell für die weitere Therapieplanung, scheint bei Betrachtung der Ergebnisse dieser beiden hier vorgestellten Studien eine Genotypisierung von CED-Patienten durchaus sinnvoll zu sein. Angesichts der Häufigkeiten und der Lokalisation der *CARD15*-Mutationen ist sicherlich eine initiale Fokussierung auf die drei Hauptmutationen des *CARD15*-Gens (p.R702W, p.G908R und p.1007fs) zum Beispiel mittels RLFP-Analysen sinnvoll. Eine Untersuchung weiterer Regionen des *CARD15*-Gens durch eine Sequenzierung der DNA ist vorzugsweise bei Patienten angebracht, die sich bereits in jungen Jahren mit einem schweren Krankheitsbild präsentieren. Hierbei sollten präferentiell Exons mit einer hohen Mutationsfrequenz genotypisiert werden, also den Ergebnissen unserer Studie und der großen Sequenzierungsstudie von Lesage et al. zufolge das komplette Exon 4 und das Exon 5 (Lesage et al. 2002).

Um die klinische Bedeutung der *CARD15*-Mutationen zur Identifikation von genetisch determinierten Hochrisikopatienten mit einer CED genauer zu definieren, wird derzeit am Universitätsklinikum München-Grosshadern eine prospektive doppelblinde Studie durchgeführt. Patienten, die die Ambulanz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen erstmals konsultieren und ein schweres Krankheitsbild der CED in jungen Jahren zeigen (analog zum Krankheitsbild der Patienten in den Subkohorten der beiden vorgestellten Studien) werden auf Veränderungen im *CARD15*-Gen hin untersucht. Ziel ist es hierbei, vom Phänotyp des Patienten ausgehend den assoziierten Genotyp vorherzusagen. Patienten mit einem schweren Krankheitsbild müssten demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit homozygote oder zusammengesetzt heterozygote Merkmalsträger sein. Damit könnte der *CARD15*-Genotyp als zusätzlicher Marker routinemässig in der Klinik eingesetzt werden, um genetisch determinierte Subpopulationen von Morbus Crohn-Patienten zuverlässig zu identifizieren. Zusätzliche Informationen, die der Kliniker dadurch über seinen Patienten erfahren könnte, würden ihm eine Einstufung in eine bestimmte Kategorie von Patienten mit einem ähnlichen Krankheitsbild und Krankheitsverlauf erleichtern. Eine rasche eindeutige Diagnose und eine definitive

Therapieplanung mit konsekutiv verbesserter Therapie, die für den CED Patienten individuell optimiert werden kann, wäre somit möglich.

Herkömmliche Klassifikationen einer CED wie die Wiener Klassifikation des MC-Phänotyps von 1998, die hauptsächlich klinische Kriterien wie zum Beispiel das Geschlecht, das Alter bei Erstdiagnose, die Lokalisation der Erkrankung, den Krankheitsverlauf oder das Auftreten von Komplikationen zur Einstufung verwenden, müssen sicherlich durch die zusätzlichen Informationen aus genetischen und serologischen Untersuchungen (hier insbesondere ASCA und pANCA) erweitert werden, um eine exaktere und auch konstante Klassifikation über einen längeren Zeitraum zu ermöglichen (Gasche et al. 2000).

Ein grosses Problem der vor allem auf klinischen Kriterien basierenden Wiener Klassifikation des Morbus Crohn ist eine exakte Einstufung des Krankheitsverlaufs bei Morbus Crohn-Patienten. So veränderte sich in einigen untersuchten Patientenkohorten das klinische Erscheinungsbild des Morbus Crohn infolge der raschen Progression der Erkrankung (Louis et al. 2001, Cosnes et al. 2002). Es wechselte von einem primär inflammatorischen Erscheinungsbild (nach der Wiener Klassifikation als nicht-penetrierend und nicht-stenosierend eingestuft) zu einem schwereren Krankheitsbild mit dem Auftreten von Komplikationen wie Penetrierungen in das extraintestinale Gewebe oder der Ausbildung von Stenosen. Eine exakte Klassifizierung der Erkrankung über einen längeren Zeitraum und eine Vorhersage des Krankheitsverlaufs ist somit anhand wechselnder klinischer Charakteristika schwierig. Damit ist auch eine optimale Therapieplanung für den CED-Patienten schwierig. Dabei sollte eine langfristige Therapieplanung ja gerade zu Krankheitsbeginn bei der Erstdiagnose der CED erfolgen, um einen möglichst grossen therapeutischen Nutzen zu erzielen und das Auftreten von Komplikationen zu minimieren. Hierbei könnte die Kenntnis vor allem des Genotyps eines CED-Patienten von grösster Bedeutung zur Einstufung der CED sein. Eine zusätzliche Aufnahme von genetischen und serologischen Informationen zur Klassifikationen der CED wurde deshalb auch im Jahre 2005 im Rahmen des "Montreal World Congress of Gastroenterology" umfassend diskutiert und beschlossen (Silverberg et al. 2005).

Weitere klinische Studien wie die aktuelle Studie der Ambulanz für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen am Universitätsklinikum München-Grosshadern sind sicherlich notwendig, um

den klinischen Nutzen der Kenntnis des *CARD15*-Genotyps noch genauer zu definieren. Trotz der Etablierung vieler *in vivo*-Modelle, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden, bleiben darüberhinaus noch viele Fragen zur Funktion von NOD2 offen, insbesondere im Hinblick auf die Mechanismen der Signaltransduktion.

6. Literaturverzeichnis

1. Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Arditi M. TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 2002a Jun 7;277(23):20431-7.

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. 2002b Sep;123(3):679-88.

3. Abreu MT. Nod2 in normal and abnormal intestinal immune function. Gastroenterology. 2005 Oct;129(4):1302-4.

4. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther. 2001 Jun;15(6):731-48.

5. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. Gastroenterology. 2002 Apr;122(4):854-66.

6. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol. 2004 Jul;4(7):499-511.

7. Akolkar PN, Gulvani-Akolkar B, Lin XY, Zhou Z, Daly M, Katz S, Levine J, Present D, Gelb B, Desnick R, Mayer L, Silver J. The IBD1 locus for susceptibility to Crohn's disease has a greater impact in Ashkenazi Jews with early onset disease. Am J Gastroenterol 2001 Apr;96(4):1127-32.

8. Andres PG, Friedman LS. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. Gastroenterol Clin North Am. 1999 Jun;28(2):255-81.

9. Annese V, Latiano A, Bovio P, Forabosco P, Piepoli A, Lombardi G, Andreoli A, Astegiano M, Gionchetti P, Riegler G, Sturniolo GC, Clementi M, Rappaport E, Fortina P, Devoto M, Gasparini P, Andriulli A. Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus-a GISC study. Eur J Hum Genet. 1999 Jul;7(5):567-73.

10. Annese V, Palmieri O, Latiano A, Ardizzone S, Castiglione F, Cottone M, D'Inca R, Gionchetti P, Papi C, Riegler G, Vecchi M, Andriulli A; Italian Group for Inflammatory Bowel Disease. Frequency of NOD2/CARD15 variants in both sporadic and familial cases of Crohn's disease across Italy. An Italian Group for Inflammatory Bowel Disease Study. Dig Liver Dis. 2004 Feb;36(2):121-4.

11. Annese V, Lombardi G, Perri F, D'Inca R, Ardizzone S, Riegler G, Giaccari S, Vecchi M, Castiglione F, Gionchetti P, Cocchiara E, Vigneri S, Latiano A, Palmieri O, Andriulli A. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease--an IG-IBD study. Am J Gastroenterol. 2005 Jan;100(1):84-92.

12. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet. 2000 Jun;25(2):187-91.

13. Arnott ID, Nimmo ER, Drummond HE, Fennell J, Smith BR, MacKinlay E, Morecroft J, Anderson N, Kelleher D, O'Sullivan M, McManus R, Satsangi J. NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? Genes Immun. 2004 Aug;5(5):417-25.

14. Bairead E, Harmon DL, Curtis AM, Kelly Y, O'Leary C, Gardner M, Leahy DT, Vaughan P, Keegan D, O'Morain C, O'Donoghue D, Shanahan F, Parfrey NA, Quane KA. Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogenous Irish population. Eur J Hum Genet. 2003 Mar;11(3):237-44.

15. Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F; American College of Physicians; American Physiological Society. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. Ann Intern Med. 2005 Dec 20;143(12):895-904.

16. Barmada MM, Brant SR, Nicolae DL, Achkar JP, Panhuysen CI, Bayless TM, Cho JH, Duerr RH. A genome scan in 260 inflammatory bowel disease-affected relative pairs. Inflamm Bowel Dis. 2004 Sep;10(5):513-20.

17. Barnich N, Hisamatsu T, Aguirre JE, Xavier R, Reinecker HC, Podolsky DK. GRIM-19 interacts with nucleotide oligomerization domain 2 and serves as downstream effector of anti-bacterial function in intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):19021-6.

18. Bayless TM, Tokayer AZ, Polito JM 2nd, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. Gastroenterology. 1996 Sep;111(3):573-9.

19. Becker JM. Surgical management of ulcerative colitis. In: Inflammatory Bowel Disease, MacDermott, RP, Stenson, WF (Eds), Elsevier, New York 1992. p.599.

20. Bernstein CN, Blanchard JF, Leslie W, Wajda A, Yu BN. The incidence of fracture among patients with inflammatory bowel disease. A population-based cohort study. Ann Intern Med. 2000 Nov 21;133(10):795-9.

21. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. Cancer. 2001a Feb 15;91(4):854-62.

22. Bernstein CN, Blanchard JF, Houston DS, Wajda A. The incidence of deep venous thrombosis and pulmonary embolism among patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. Thromb Haemost. 2001b Mar;85(3):430-4.

23. Berrebi D, Maudinas R, Hugot JP, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cezard JP, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M. Card15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon. Gut. 2003 Jun;52(6):840-6.

24. Binder V, Both H, Hansen PK, Hendriksen C, Kreiner S, Torp-Pedersen K. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in the County of Copenhagen, 1962 to 1978. Gastroenterology. 1982 Sep;83(3):563-8.

25. Bjornsson S, Johannsson JH. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000 Jan;12(1):31-8.

26. Bonen DK, Nicolae DL, Moran T et al. Racial differences in Nod2 variation: Characterization of Nod2 in African-Americans with Crohn's disease: a cohort study. Gastroenterology 2002; 122(Suppl):A-29.

27. Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nunez G. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a

signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. Gastroenterology. 2003a Jan;124(1):140-6.

28. Bonen DK, Cho JH. The genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2003b Feb;124(2):521-36.

29. Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. Nat Rev Immunol. 2003 Jul;3(7):521-33.

30. 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. 2005a Jul;11(7):645-52.

31. Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S; Seiderer J; Tillack C; Konrad A; Göke B, Ochsenkühn 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 2005b Nov;100:1–8.

32. Brostrom O, Lofberg R, Nordenvall B, Ost A, Hellers G. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. An epidemiologic study. Scand J Gastroenterol. 1987 Dec;22(10):1193-9.

33. Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H. Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation? Gut. 2006 Mar;55(3):342-7.

34. Calkins BM. A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci. 1989 Dec;34(12):1841-54.

35. Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance.J Endotoxin Res. 2000;6(3):205-14.

36. Card T, Hubbard R, Logan RF. Mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. Gastroenterology. 2003 Dec;125(6):1583-90.

37. Cario E, Rosenberg IM, Brandwein SL, Beck PL, Reinecker HC, Podolsky DK. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. J Immunol. 2000a Jan 15;164(2):966-72.

38. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. Infect Immun. 2000b Dec;68(12):7010-7.

39. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. Gut. 2005 Aug;54(8):1182-93.

40. Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, Stanford PM, Sraml ME, Gorska M, Crawford J, Whitmore SA, Shlegel C, Foote S, Kohonen-Corish M, Pavli P. Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. Ann Hum Genet. 1998 Jul;62(Pt 4):291-8.

41. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, Magarry GR, Butler WJ, Eaden JA, Roberts-Thomson IC, Pavli P, Wilson SR, Callen DF.

CARD15/NOD2 risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. Ann Hum Genet. 2003 Jan;67(Pt 1):35-41.

42. Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, Baty C, Apodaca G, Hackam DJ. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. J Biol Chem. 2004 Jun 4;279(23):24592-600.

43. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, Zouali H, Lesage S, Chareyre F, Bui TH, Giovannini M, Zaehringer U, Penard-Lacronique V, Sansonetti PJ, Hugot JP, Thomas G. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003a Mar 18;100(6):3455-60.

44. Chamaillard M, Hashimoto M, Horie Y, Masumoto J, Qiu S, Saab L, Ogura Y, Kawasaki A, Fukase K, Kusumoto S, Valvano MA, Foster SJ, Mak TW, Nunez G, Inohara N. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. Nat Immunol. 2003b Jul;4(7):702-7.

45. Chamaillard M, Girardin SE, Viala J, Philpott DJ. Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. Cell Microbiol. 2003c Sep;5(9):581-92.

46. Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HM, Schwartz MR, Naser S, Shafran I, El-Zaatari FA. Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther. 2001 Mar;15(3):337-46.

47. Chen CM, GongY, Zhang M, Chen JJ. Reciprocal cross-talk between Nod2 and TAK1 signaling pathways. J Biol Chem. 2004 Jun 11;279(24):25876-82.

48. 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. 1998 Jun 23;95(13):7502-7.

49. Cho JH. Significant role of genetics in IBD: the NOD2 gene. Rev Gastroenterol Disord. 2003;3 Suppl 1:S18-22.

50. Choi PM, Zelig MP. Similarity of colorectal cancer in Crohn's disease and ulcerative colitis: implications for carcinogenesis and prevention. Gut. 1994 Jul;35(7):950-4.

51. Coremans G, Rutgeerts P, Geboes K, Van den Oord J, Ponette E, Vantrappen G. The value of ileoscopy with biopsy in the diagnosis of intestinal Crohn's disease. Gastrointest Endosc. 1984 Jun;30(3):167-72.

52. Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Le Quintrec Y, Gendre JP. Effects of cigarette smoking on the long-term course of Crohn's disease. Gastroenterology. 1996 Feb;110(2):424-31.

53. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre JP. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2002 Jul;8(4):244-50.

54. Cottone M, Cipolla C, Orlando A, Oliva L, Aiala R, Puleo A. Epidemiology of Crohn's disease in Sicily: a hospital incidence study from 1987 to 1989. "The Sicilian Study Group of Inflammatory Bowel Disease". Eur J Epidemiol. 1991 Nov;7(6):636-40.

55. Crohn BB, Ginzburg L and Oppenheimer GD. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. JAMA 1932; 99: 1323-1329.

56. Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J. Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. Gastroenterology. 1998 Nov;115(5):1066-71.

57. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJ, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2002 Apr;122(4):867-74.

58. Daly MJ, Pearce AV, Farwell L, Fisher SA, Latiano A, Prescott NJ, Forbes A, Mansfield J, Sanderson J, Langelier D, Cohen A, Bitton A, Wild G, Lewis CM, Annese V, Mathew CG, Rioux JD. Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease. Eur J Hum Genet. 2005 Jul;13(7):835-9.

59. Danese S, Semeraro S, Papa A, Roberto I, Scaldaferri F, Fedeli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2005 Dec 14;11(46):7227-36.

60. Danovitch SH. Fulminant colitis and toxic megacolon. Gastroenterol Clin North Am 1989 Mar;18(1):73-82.

61. Danze PM, Colombel JF, Jacquot S, Loste MN, Heresbach D, Ategbo S, Khamassi S, Perichon B, Semana G, Charron D, Cezard JP. Association of HLA class II genes with susceptibility to Crohn's disease. Gut. 1996 Jul;39(1):69-72.

62. Dayhoff M, Schwartz R, and Orcutt B. A model of evolutionary change in protein. Atlas Protein Seq Struct 5; 1979: 345-52.

63. Devroede GJ, Taylor WF, Sauer WG, Jackman RJ, Stickler GB. Cancer risk and life expectancy of children with ulcerative colitis. N Engl J Med. 1971 Jul 1;285(1):17-21.

64. 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 1998 Jul;63 (1):95-100.

65. 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. 2000 Jun;66(6):1857-62.

66. Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Achkar JP, Cho JH, Hanauer SB, Brant SR, Bayless TM, Baldassano RN, Weeks DE. Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. Hum Mol Genet. 2002 Oct 1;11(21):2599-606.

67. Eaden J, Abrams K, Ekbom A, Jackson E, Mayberry J. Colorectal cancer prevention in ulcerative colitis: a case-control study. Aliment Pharmacol Ther. 2000 Feb;14(2):145-53.

68. Eckmann L, Karin M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function? Immunity. 2005 Jun;22(6):661-7.

69. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. Am J Gastroenterol. 2004 Dec;99(12):2393-404.

70. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. N Engl J Med. 1990 Nov 1;323(18):1228-33.

71. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. Gastroenterology. 1991a Feb;100(2):350-8.

72. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Extracolonic malignancies in inflammatory bowel disease. Cancer. 1991b Apr 1;67(7):2015-9.

73. Ekbom A, Helmick CG, Zack M, Holmberg L, Adami HO. Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. Gastroenterology. 1992 Sep;103(3):954-60.

74. Ekbom A. Indeterminate IBD: The magnitude of the problem: Inflamm Bowel Dis 2000;6:14-15.

75. Elson CO. Genes, microbes, and T cells--new therapeutic targets in Crohn's disease. N Engl J Med. 2002 Feb 21;346(8):614-6.

76. Esters N, Pierik M, van Steen K, Vermeire S, Claessens G, Joossens S, Vlietinck R, Rutgeerts P. Transmission of CARD15 (NOD2) variants within families of patients with inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2004 Feb;99(2):299-305.

77. Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr. Clinical patterns in Crohn's disease: a statistical study of 615 cases. Gastroenterology. 1975 Apr;68(4 Pt 1):627-35.

78. Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol. 1980 May;9(2):271-7.

79. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. Gastroenterology. 1998 Jul;115(1):182-205.

80. Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. Gut. 2004 Jul;53(7):987-92.

81. Freeman HJ. Application of the Vienna Classification for Crohn's disease to a single clinician database of 877 patients. Can J Gastroenterol. 2001 Feb;15(2):89-93.

82. Fusunyan RD, Nanthakumar NN, Baldeon ME, Walker WA. Evidence for an innate immune response in the immature human intestine: toll-like receptors on fetal enterocytes. Pediatr Res 2001 Apr;49(4):589–93.

83. Futami S, Aoyama N, Honsako Y, Tamura T, Morimoto S, Nakashima T, Ohmoto A, Okano H, Miyamoto M, Inaba H, et al. HLA-DRB1*1502 allele, subtype of DR15, is associated with susceptibility to ulcerative colitis and its progression. Dig Dis Sci. 1995 Apr;40(4):814-8.

84. 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. 2000 Feb;6(1):8-15.

85. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. World J Gastroenterol. 2005 Feb 7;11(5):681-5.

86. Geboes K, De Hertogh G. Indeterminate colitis. Inflamm Bowel Dis. 2003 Sep;9(5):324-31.

87. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. Lancet. 1994 Mar 26;343(8900):766-7.

88. Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol. 2001 Aug 15;167(4):1882-5.

89. Ghosh S, Armitage E, Wilson D, Minor PD, Afzal MA. Detection of persistent measles virus infection in Crohn's disease: current status of experimental work. Gut. 2001 Jun;48(6):748-52.

90. Giallourakis C, Stoll M, Miller K, Hampe J, Lander ES, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. Am J Hum Genet. 2003 Jul;73(1):205-11.

91. Gilat T, Fireman Z, Grossman A, Hacohen D, Kadish U, Ron E, Rozen P, Lilos P. Colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. A population study in central Israel. Gastroenterology. 1988 Apr;94(4):870-7.

92. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. J Biol Chem. 2003a Mar 14;278(11):8869-72.

93. Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jehanno M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zahringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. Science. 2003b Jun 6;300(5625):1584-7.

94. Gitkind MJ, Wright SC. Amyloidosis complicating inflammatory bowel disease. A case report and review of the literature. Dig Dis Sci 1990 Jul;35(7):906-8.

95. Greenstein AJ, Sachar DB, Gibas A, Schrag D, Heimann T, Janowitz HD, Aufses AH Jr. Outcome of toxic dilatation in ulcerative and Crohn's colitis. J Clin Gastroenterol. 1985 Apr;7(2):137-43.

96. Guindi M, Riddell RH. Indeterminate colitis. J Clin Pathol. 2004 Dec;57(12):1233-44.

97. Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, Fontalba A, Ogura Y, Prosper F, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. J Biol Chem. 2002 Nov 1;277(44):41701-5.

98. Hale W, Floch M, Burakoff R, Itzkowitz S, Warren B, Plevy S. Indeterminate colitis. J Clin Gastroenterol. 2004 May-Jun;38(5 Suppl):S57.

99. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. Gastroenterology 2003 Jun;124(7):1767-73.

100. Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C. IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. J Biol Chem. 2002 Oct 11;277(41):38168-78.

101. Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. Am J Hum Genet. 1999a Mar;64(3):808-16.

102. 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. 1999b Dec;65(6):1647-55.

103. Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, Bridger S, Macpherson AJ, Stokkers P, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. Gut. 2001a Feb;48(2):191-7.

104. 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. 2001b Jun 16;357(9272):1925-8.

105. Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, Croucher PJ, Cuthbert A, Mascheretti S, Huse K, Platzer M, Bridger S, Meyer B, Nurnberg P, Stokkers P, Krawczak M, Mathew CG, Curran M, Schreiber S. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jan 8;99(1):321-6.

106. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P; ACCENT I Study Group. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. Lancet. 2002 May 4;359(9317):1541-9.

107. Hanauer SB. Crohn's disease: step up or top down therapy. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003 Feb;17(1):131-7.

108. Hanauer SB, Korelitz BI, Rutgeerts P, Peppercorn MA, Thisted RA, Cohen RD, Present DH. Postoperative maintenance of Crohn's disease remission with 6-mercaptopurine, mesalamine, or placebo: a 2-year trial. Gastroenterology. 2004 Sep;127(3):723-9.

109. Hart AL, Stagg AJ, Kamm MA. Use of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. J Clin Gastroenterol. 2003 Feb;36(2):111-9.

110. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. Gastroenterology. 2002 Jun;122(7):1987-2000.

111. Helio T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Farkkila M, Krusius T, Kontula K. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familially occurring and complicated forms of Crohn's disease. Gut. 2003 Apr;52(4):558-62.

112. Hiatt RA, Kaufman L. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a defined northern California population. West J Med. 1988 Nov;149(5):541-6.

113. Hildebrand H, Fredrikzon B, Holmquist L, Kristiansson B, Lindquist B. Chronic inflammatory bowel disease in children and adolescents in Sweden. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1991 Oct;13(3):293-7.

114. Hildebrand H, Finkel Y, Grahnquist L, Lindholm J, Ekbom A, Askling J. Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990-2001. Gut. 2003 Oct;52(10):1432-4.

115. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 2003 Apr;124(4):993-1000.

116. Hoffmann JA. The immune response of Drosophila. Nature. 2003 Nov 6;426(6962):33-8.

117. Holden W, Orchard T, Wordsworth P. Enteropathic arthritis. Rheum Dis Clin North Am. 2003 Aug;29(3):513-30, viii.

118. Hommes D, Baert F, Van Assche G, Caenepeel F, Vergauwe P, Tuynman H, De Vos M, van Deventer S, Stitt L, Rutgeerts P, Feagan B, D'Haens G. Management of recent onset Crohn's disease: A controlled, randomized trial comparing step-up and top-down therapy (abstract). Gastroenterology. 2005 Jul;129(1):371.

119. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature. 1996 Feb 29;379(6568):821-3.

120. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature. 2001 May 31;411(6837):599-603.

121. Hugot JP. [Role of NOD2 gene in Crohn's disease] Gastroenterol Clin Biol. 2002;26(1):13-5.

122. Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. Annu Rev Phytopathol. 2001;39:285-312.

123. Hutchinson R, Tyrrell PN, Kumar D, Dunn JA, Li JK, Allan RN. Pathogenesis of gall stones in Crohn's disease: an alternative explanation. Gut. 1994 Jan;35(1):94-7.

124. IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. Am J Hum Genet. 2001 May;68(5):1165-71.

125. Inohara N, Koseki T, del Peso L, Hu Y, Yee C, Chen S, Carrio R, Merino J, Liu D, Ni J, Nunez G. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. J Biol Chem. 1999 May 21;274(21):14560-7.

126. Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nunez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. J Biol Chem. 2001 Jan 26;276(4):2551-4.

127. Inohara N, Ogura Y, Nunez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. Curr Opin Microbiol. 2002 Feb;5(1):76-80.

128. Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem. 2003a Feb 21;278(8):5509-12.

129. Inohara N, Nunez G. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. Nat Rev Immunol. 2003b May;3(5):371-82.

130. Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nunez G. NOD-LRR Proteins: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. Annu Rev Biochem 2005 Jul;74:355-83.

131. Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Nunez G, Kishi Y, Koike Y, Shimosegawa T, Shimoyama T, Hibi T. Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. Gastroenterology. 2002 Jul;123(1):86-91.

132. Irving PM, Pasi KJ, Rampton DS. Thrombosis and inflammatory bowel disease. Clin Gastroenterol Hepatol. 2005 Jul;3(7):617-28.

133. Isaacs KL, Sartor RB. Treatment of inflammatory bowel disease with antibiotics. Gastroenterol Clin North Am. 2004 Jun;33(2):335-45.

134. Ishihara S, Rumi MA, Kadowaki Y, Ortega-Cava CF, Yuki T, Yoshino N, Miyaoka Y, Kazumori H, Ishimura N, Amano Y, Kinoshita Y. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during Helicobacter pylori-associated gastritis. J Immunol. 2004 Jul 15;173(2):1406-16.

135. Jalan KN, Sircus W, Card WI, Falconer CW, Bruce CB, Crean GP, McManus JP, Small WP, Smith AN. An experience of ulcerative colitis. I. Toxic dilation in 55 cases. Gastroenterology. 1969 Jul;57(1):68-82.

136. Jess T, Winther KV, Munkholm P, Langholz E, Binder V. Mortality and causes of death in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. Gastroenterology. 2002 Jun;122(7):1808-14.

137. Joossens S, Reinisch W, Vermeire S, Sendid B, Poulain D, Peeters M, Geboes K, Bossuyt X, Vandewalle P, Oberhuber G, Vogelsang H, Rutgeerts P, Colombel JF. The value of serologic markers in indeterminate colitis: a prospective follow-up study. Gastroenterology. 2002 May;122(5):1242-7.

138. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. Nat Immunol. 2002 Mar;3(3):221-7.

139. Karlen P, Lofberg R, Brostrom O, Leijonmarck CE, Hellers G, Persson PG. Increased risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study. Am J Gastroenterol. 1999 Apr;94(4):1047-52.

140. Kathpalia SC, Favus MJ, Coe FL. Evidence for size and charge permselectivity of rat ascending colon. Effects of ricinoleate and bile salts on oxalic acid and neutral sugar transport. J Clin Invest 1984 Sep;74(3):805-11.

141. Kelsall B. Getting to the guts of NOD2. Nat Med. 2005 Apr;11(4):383-4.

142. Kobayashi KS, Chamaillard M, Ogura Y, Henegariu O, Inohara N, Nunez G, Flavell RA. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. Science. 2005 Feb 4;307(5710):731-4.

143. Kyle J. Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review. Gastroenterology. 1992 Aug;103(2):392-9.

144. Lahaire D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. Gastroenterology 2001 Mar;120(4):816-19.

145. Lakatos PL, Lakatos L, Szalay F, Willheim-Polli C, Osterreicher C, Tulassay Z, Molnar T, Reinisch W, Papp J, Mozsik G, Ferenci P; Hungarian IBD Study Group. Toll-like receptor 4 and NOD2/CARD15 mutations in Hungarian patients with Crohn's disease: phenotype-genotype correlations. World J Gastroenterol. 2005 Mar 14;11(10):1489-95.

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

147. Lashner BA, Shaheen NJ, Hanauer SB, Kirschner BS. Passive smoking is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease in children. Am J Gastroenterol. 1993 Mar;88(3):356-9.

148. Le Berre N, Heresbach D, Kerbaol M, Caulet S, Bretagne JF, Chaperon J, Gosselin M, Ramee MPl. Histological discrimination of idiopathic inflammatory bowel disease from other types of colitis. J Clin Pathol. 1995 Aug;48(8):749-53.

149. Lee KS, Medline A, Shockey S. Indeterminate colitis in the spectrum of inflammatory bowel disease. Arch Pathol Lab Med. 1979 Apr;103(4):173-6.

150. Leong RW, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JJ. NOD2/CARD15 gene polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. Aliment Pharmacol Ther. 2003 Jun 15;17(12):1465-70.

151. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP, EPWG-IBD Group, EPIMAD Group, GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. Am J Hum Genet. 2002 Apr;70(4):845-57.

152. Lewis JD, Bilker WB, Brensinger C, Deren JJ, Vaughn DJ, Strom BL. Inflammatory bowel disease is not associated with an increased risk of lymphoma. Gastroenterology. 2001 Nov;121(5):1080-7.

153. Loftus EV Jr, Silverstein MD, Sandborn WJ, Tremaine WJ, Harmsen WS, Zinsmeister AR. Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence, and survival. Gastroenterology. 1998 Jun;114(6):1161-8.

154. Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Habermann TM, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. Risk of lymphoma in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2000 Sep;95(9):2308-12.

155. Loftus EV Jr, Sandborn WJ. Lymphoma risk in inflammatory bowel disease: influences of referral bias and therapy. Gastroenterology. 2001 Nov;121(5):1239-42.

156. Loftus EV Jr, Crowson CS, Sandborn WJ, Tremaine WJ, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Long-term fracture risk in patients with Crohn's disease: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. Gastroenterology. 2002 Aug;123(2):468-75.

157. Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. Gut. 2001 Dec;49(6):777-82.

158. Louis E, Michel V, Hugot JP, Reenaers C, Fontaine F, Delforge M, El Yafi F, Colombel JF, Belaiche J. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. Gut. 2003 Apr;52(4):552-7.

159. Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang H. A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 1999 Nov;5(4):271-8.

160. Maeda S, Hsu LC, Liu H, Bankston LA, Iimura M, Kagnoff MF, Eckmann L, Karin M. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-κB activity and IL-1ß processing. Science 2005 Feb 4;307(5710):734-8.

161. Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W; Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. N Engl J Med. 2004 Nov 11;351(20):2069-79.

162. Marodi L. Innate cellular immune responses in newborns. Clin Immunol. 2006 Feb-Mar;118(2-3):137-44.

163. Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. Trends Immunol. 2005 Aug;26(8):447-54.

164. Mascheretti S, Hampe J, Kuhbacher T, Herfarth H, Krawczak M, Folsch UR, Schreiber S. Pharmacogenetic investigation of the TNF/TNF-receptor system in patients with chronic active Crohn's disease treated with infliximab. Pharmacogenomics J. 2002a;2(2):127-36.

165. Mascheretti S, Hampe J, Croucher PJ, Nikolaus S, Andus T, Schubert S, Olson A, Bao W, Folsch UR, Schreiber S. Response to infliximab treatment in Crohn's disease is not associated with mutations in the CARD15 (NOD2) gene: an analysis in 534 patients from two multicenter, prospective GCP-level trials. Pharmacogenetics. 2002b Oct;12(7):509-15.

166. McGovern DP, Van Heel DA, Negoro K, Ahmad T, Jewell DP. Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis. Am J Hum Genet. 2003 Dec;73(6):1465-6.

167. McGovern DP, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WO, Jewell DP. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. Hum Mol Genet. 2005 May 15;14(10):1245-50.

168. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2001 Nov;1(2):135-45.

169. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science. 2002 Apr 12;296(5566):298-300.

170. Mekhjian HS, Switz DM, Melnyk CS, Rankin GB, Brooks RK. Clinical features and natural history of Crohn's disease. Gastroenterology. 1979 Oct;77(4 Pt 2):898-906.

171. Mendoza JL, Murillo LS, Fernandez L, Pena AS, Lana R, Urcelay E, Cruz-Santamaria DM, de la Concha EG, Diaz-Rubio M, Garcia-Paredes J. Prevalence of mutations of the NOD2/CARD15 gene and relation to phenotype in Spanish patients with Crohn disease. Scand J Gastroenterol. 2003 Dec;38(12):1235-40.

172. Meucci G, Bortoli A, Riccioli FA, Girelli CM, Radaelli F, Rivolta R, Tatarella M. Frequency and clinical evolution of indeterminate colitis: a retrospective multi-centre study in northern Italy. GSMII (Gruppo di Studio per le Malattie Infiammatorie Intestinali). Eur J Gastroenterol Hepatol. 1999 Aug;11(8):909-13.

173. Mir-Madjlessi SH, Farmer RG, Easley KA, Beck GJ. Colorectal and extracolonic malignancy in ulcerative colitis. Cancer. 1986 Oct 1;58(7):1569-74.

174. Mirza MM, Fisher SA, King K, Cuthbert AP, Hampe J, Sanderson J, Mansfield J, Donaldson P, Macpherson AJ, Forbes A, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG. Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. Am J Hum Genet. 2003 Apr;72(4):1018-22.

175. Mottet NK. Histopathologic spectrum of regional enteritis and ulcerative colitis. Major Probl Pathol. 1971;2:1-249.

176. Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, Schulz T, Stray N, Fausa O. Inflammatory bowel disease: re-evaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway. Gut. 1997 Mar;40(3):328-32.

177. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

178. Negoro K, McGovern DP, Kinouchi Y, Takahashi S, Lench NJ, Shimosegawa T, Carey A, Cardon LR, Jewell DP, van Heel DA. Analysis of the IBD5 locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease. Gut. 2003 Apr;52(4):541-6.

179. Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber TH, Drenth JP, Van der Meer JW. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. Eur J Immunol. 2004 Jul;34(7):2052-9.

180. Newman B, Silverberg MS, Gu X, Zhang Q, Lazaro A, Steinhart AH, Greenberg GR, Griffiths AM, McLeod RS, Cohen Z, Fernandez-Vina M, Amos CI, Siminovitch K. CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. Am J Gastroenterol. 2004 Feb;99(2):306-15.

181. Newman B, Gu X, Wintle R, Cescon D, Yazdanpanah M, Liu X, Peltekova V, Van Oene M, Amos CI, Siminovitch KA. A risk haplotype in the Solute Carrier Family 22A4/22A5 gene cluster influences phenotypic expression of Crohn's disease. Gastroenterology. 2005a Feb;128(2):260-9.

182. Newman B and Siminovitch KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. Curr Opin Gastroenterol. 2005b Jul;21(4):401-7.

183. Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Smith L, Arnott ID, Satsangi J. DLG5 variants do not influence susceptibility to inflammatory bowel disease in the Scottish population. Gut. 2005 Oct;54(10):1416-20.

184. Nostrant TT, Kumar NB, Appelman HD. Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis. Gastroenterology. 1987 Feb;92(2):318-28.

185. Nuako KW, Ahlquist DA, Mahoney DW, Schaid DJ, Siems DM, Lindor NM. Familial predisposition for colorectal cancer in chronic ulcerative colitis: a case-control study. Gastroenterology. 1998 Nov;115(5):1079-83.

186. Obialo CI, Clayman RV, Matts JP, Fitch LL, Buchwald H, Gillis M, Hruska KA. Pathogenesis of nephrolithiasis post-partial ileal bypass surgery: Case-control study. The POSCH Group. Kidney Int 1991 Jun;39(6):1249-54.

187. 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. 2001a Feb 16;276(7):4812-8.

188. 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. 2001b May 31;411(6837):603-6.

189. Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nunez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. Gut. 2003 Nov;52(11):1591-7.

190. Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N. Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. Hum Mol Genet. 1996 Oct;5(10):1679-83.

191. Oostenbrug LE, Drenth JP, de Jong DJ, Nolte IM, Oosterom E, van Dullemen HM, van der Linde K, te Meerman GJ, van der Steege G, Kleibeuker JH, Jansen PL. Association between Toll-like receptor 4 and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis. 2005 Jun;11(6):567-75.

192. Orchard TR, Satsangi J, Van Heel D, Jewell DP. Genetics of inflammatory bowel disease: a reappraisal. Scand J Immunol. 2000 Jan;51(1):10-7.

193. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen TI, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. N Engl J Med. 1991 Jan 10;324(2):84-8.

194. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. Scand J Gastroenterol. 2000 Oct;35(10):1075-81.

195. Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. J Immunol. 2003 Apr 15;170(8):3977-85.

196. Otte JM, Cario E, Podolsky DK. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 2004 Apr;126(4):1054-70.

197. Ouburg S, Mallant-Hent R, Crusius JB, van Bodegraven AA, Mulder CJ, Linskens R, Pena AS, Morre SA. The toll-like receptor 4 (TLR4) Asp299Gly polymorphism is associated with colonic localisation of Crohn's disease without a major role for the Saccharomyces cerevisiae mannan-LBP-CD14-TLR4 pathway. Gut. 2005 Mar;54(3):439-40.

198. Paavola-Sakki P, Ollikainen V, Helio T, Halme L, Turunen U, Lahermo P, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. Eur J Hum Genet. 2003 Feb;11(2):112-20.

199. Palli D, Trallori G, Saieva C, Tarantino O, Edili E, D'Albasio G, Pacini F, Masala G. General and cancer specific mortality of a population based cohort of patients with inflammatory bowel disease: the Florence Study. Gut. 1998 Feb;42(2):175-9.

200. Palli D, Trallori G, Bagnoli S, Saieva C, Tarantino O, Ceroti M, d'Albasio G, Pacini F, Amorosi A, Masala G. Hodgkin's disease risk is increased in patients with ulcerative colitis. Gastroenterology. 2000 Sep;119(3):647-53.

201. Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. Am J Hum Genet. 2000 Dec;67(6):1605-10.

202. Pauleau AL, Murray PJ. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. Mol Cell Biol. 2003 Nov;23(21):7531-9.

203. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet. 2004 May;36(5):471-5.

204. Pera A, Bellando P, Caldera D, Ponti V, Astegiano M, Barletti C, David E, Arrigoni A, Rocca G, Verme G. Colonoscopy in inflammatory bowel disease. Diagnostic accuracy and proposal of an endoscopic score. Gastroenterology. 1987 Jan;92(1):181-5.

205. Persson PG, Karlen P, Bernell O, Leijonmarck CE, Brostrom O, Ahlbom A, Hellers G. Crohn's disease and cancer: a population-based cohort study. Gastroenterology. 1994 Dec;107(6):1675-9.

206. Persson PG, Bernell O, Leijonmarck CE, Farahmand BY, Hellers G, Ahlbom A. Survival and cause-specific mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. Gastroenterology. 1996 May;110(5):1339-45.

207. Petrelli EA, McKinley M, Troncale FJ. Ocular manifestations of inflammatory bowel disease. Ann Ophthalmol 1982 Apr;14(4):356-60.

208. Pierik M, Yang H, Barmada MM, Cavanaugh JA, Annese V, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Hugot JP, McGovern DP, Paavola-Sakki P, Radford-Smith GL, Pavli P, Silverberg MS, Schreiber S, Taylor KD, Vlietinck R; IBD International Genetics Consortium. The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. Inflamm Bowel Dis. 2005 Jan;11(1):1-7.

209. Pimentel M, Chang M, Chow EJ, Tabibzadeh S, Kirit-Kiriak V, Targan SR, Lin HC. Identification of a prodromal period in Crohn's disease but not ulcerative colitis. Am J Gastroenterol. 2000 Dec;95(12):3458-62.

210. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. N Engl J Med. 2002 Aug 8;347(6):417-29.

211. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. N Engl J Med. 1999 May 6;340(18):1398-405.

212. Price AB. Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease-'colitis indeterminate'. J Clin Pathol. 1978 Jun;31(6):567-77.

213. Prior P, Gyde S, Cooke WT, Waterhouse JA, Allan RN. Mortality in Crohn's disease. Gastroenterology. 1981 Feb;80(2):307-12.

214. Probert CS, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF. Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. Gut. 1992a May;33(5):687-93.

215. Probert CS, Jayanthi V, Wicks AC, Mayberry JF. Mortality from Crohn's disease in Leicestershire, 1972-1989: an epidemiological community based study. Gut. 1992b Sep;33(9):1226-8.

216. 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. 2002 Jun;122(7):2091-2.

217. Rasmussen HH, Fallingborg JF, Mortensen PB, Vyberg M, Tage-Jensen U, Rasmussen SN. Hepatobiliary dysfunction and primary sclerosing cholangitis in patients with Crohn's disease. Scand J Gastroenterol. 1997 Jun;32(6):604-10.

218. 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. 2000 Jun;66(6):1863-70.

219. Robertson DJ, Sandler RS. Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. Inflamm Bowel Dis. 2001 Feb;7(1):51-7.

220. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. Gastroenterology. 1998 Aug;115(2):357-69.

221. Rosenstiel P, Fantini M, Brautigam K, Kuhbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 2003 Apr;124(4):1001-9.

222. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Feldman E, Rotter JI. Geographic origins of Jewish patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 1989 Oct;97(4):900-4.

223. Rotter JI, Yang H, Shohat T. Genetic complexities of inflammatory bowel disease and its distribution among the Jewish people. In: Bonne-Tamir B, Adam A (eds) Genetic diversity among Jews: diseases and markers at the DNA level. Oxford University Press. New York. 1992:pp35-411.

224. Roussomoustakaki M, Koutroubakis I, Vardas EM, Dimoulios P, Kouroumalis EA, Baritaki S, Koutsoudakis G, Krambovitis E. NOD2 insertion mutation in a Cretan Crohn's disease population. Gastroenterology. 2003 Jan;124(1):272-3.

225. Rubin DT, Hanauer SB. Smoking and inflammatory bowel disease. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000 Aug;12(8):855-62.

226. Russel RK, Wilson DC and Satsangi J. Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease. Arch Dis Child. 2004 Jul;89(7):598-603.

227. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hogezand RA, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Van Deventer SJ. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. Gastroenterology. 1999 Oct;117(4):761-9.

228. Rutgeerts P, Feagan BG, Olson A, Johanns J, Travers S, Present D, Sands BE, Sandborn W, Olson A. A randomized placebo-controlled trial of infliximab therapy for active ulcerative colitis: Act I trial. Gastroenterology 2005; 128(4): A-105.

229. Sandborn WJ, Rachmilewitz D, Hanauer SB, Lichtenstein GR, de Villiers WJ, Olson A, Johanns J, Travers S, Colombel JF. Infliximab induction and maintenance therapy for ulcerative colitis: the Act 2 trial. Gastroenterology 2005; 128(4): A-104.

230. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, Kamm MA, Korzenik JR, Lashner BA, Onken JE, Rachmilewitz D, Rutgeerts P, Wild G, Wolf DC, Marsters PA, Travers SB, Blank MA, van Deventer SJ. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. N Engl J Med. 2004 Feb 26;350(9):876-85.

231. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7.

232. Sartor RB. Enteric microflora in IBD: pathogens or commensals? Inflamm Bowel Dis 1997;3:230-235.

233. Satsangi J, Rosenberg WMC, Jewell DP. The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 1994;6:413-16.

234. Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP. Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. Lancet. 1996a May 4;347(9010):1212-7.

235. 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. 1996b Oct;14(2):199-202.

236. Schreiber S, Nikolaus S and Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. Gut. 1998 Apr;42(4):477-84.

237. Schreiber S. Genetics of inflammatory bowel disease: a puzzle with contradictions? Gut. 2000 Dec;47(6):746-7.

238. Schreiber S, Rosenstiel P, Albrecht M, Hampe J, Krawczak M. Genetics of Crohn disease, an archetypal inflammatory barrier disease. Nat Rev Genet. 2005 May;6(5):376-88.

239. Schwartz DA, Loftus EV Jr, Tremaine WJ, Panaccione R, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Sandborn WJ. The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. Gastroenterology. 2002 Apr;122(4):875-80.

240. Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice. Infect Immun. 1998 Nov;66(11):5224-31.

241. Semeao EJ, Stallings VA, Peck SN, Piccoli DA. Vertebral compression fractures in pediatric patients with Crohn's disease. Gastroenterology 1997;112(5):1710-3.

242. Shanahan F. Crohn's disease. Lancet. 2002 Jan 5;359(9300):62-9.

243. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between

north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). Gut. 1996 Nov;39(5):690-7.

244. Silvennoinen JA, Karttunen TJ, Niemela SE, Manelius JJ, Lehtola JKl. A controlled study of bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. Gut 1995 Jul;37(1):71-6.

245. 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. 2005 Sep;19 Suppl A:5-36.

246. Sinclair TS, Brunt PW, Mowat NA. Nonspecific proctocolitis in northeastern Scotland: a community study. Gastroenterology. 1983 Jul;85(1):1-11.

247. Singh JC, Cruickshank SM, Newton DJ, Wakenshaw L, Graham A, Lan J, Lodge JP, Felsburg PJ, Carding SR. Toll-like receptor-mediated responses of primary intestinal epithelial cells during the development of colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2005 Mar;288(3):G514-24.

248. Smith BR, Arnott ID, Drummond HE, Nimmo ER, Satsangi J. Disease location, anti-Saccharomyces cerevisiae antibody, and NOD2/CARD15 genotype influence the progression of disease behavior in Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2004 Sep;10(5):521-8.

249. Smith PD, Smythies LE, Mosteller-Barnum M, Sibley DA, Russell MW, Merger M, Sellers MT, Orenstein JM, Shimada T, Graham MF, Kubagawa H. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. J Immunol. 2001 Sep 1;167(5):2651-6.

250. Solem CA, Loftus EV, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Venous thromboembolism in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol. 2004 Jan;99(1):97-101.

251. Stewenius J, Adnerhill I, Anderson H, Ekelund GR, Floren CH, Fork FT, Janzon L, Lindstrom C, Ogren M. Incidence of colorectal cancer and all cause mortality in non-selected patients with ulcerative colitis and indeterminate colitis in Malmo, Sweden. Int J Colorectal Dis. 1995;10(2):117-22.

252. Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. Gut. 1999 Sep;45(3):395-401.

253. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. Nat Genet. 2004 May;36(5):476-80.

254. Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. Nat Rev Immunol. 2006 Jan;6(1):9-20.

255. Sugimura K, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Wang D, Tang YM, Fischel-Ghodsian N, Targan SR, Rotter JI, Yang H. A novel NOD2/CARD15 haplotype conferring risk for Crohn disease in Ashkenazi Jews. Am J Hum Genet. 2003 Mar;72(3):509-18.

256. Sugimura M, Kinouchi Y, Takahashi S, Aihara H, Takagi S, Negoro K, Obana N, Kojima Y, Matsumoto K, Kikuchi T, Hiroki M, Oomori S, Shimosegawa T. CARD15/NOD2 mutational analysis in Japanese patients with Crohn's disease. Clin Genet. 2003 Feb;63(2):160-2.

257. Sutherland LR, Ramcharan S, Bryant H, Fick G. Effect of cigarette smoking on recurrence of Crohn's disease. Gastroenterology. 1990 May;98(5 Pt 1):1123-8.

258. Suzuki M, Hisamatsu T, Podolsky DK. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. Infect Immun. 2003 Jun;71(6):3503-11.

259. Takaesu G, Surabhi RM, Park KJ, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. J Mol Biol. 2003 Feb 7;326(1):105-15.

260. Tao Y, Yuan F, Leister RT, Ausubel FM, Katagiri F. Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene RPS2. Plant Cell. 2000 Dec;12(12):2541-2554.

261. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. N Engl J Med. 1997 Oct 9;337(15):1029-35.

262. Taylor KD, Rotter JI, Yang H. Genetics of inflammatory bowel disease. In: Targen SR, Shanahan F, Karp LC, eds. Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 2003/05;2nd Edition:21-66.

263. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. BMJ. 1996 Jan 13;312(7023):95-6.

264. Ting JP, Davis BK. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. Annu Rev Immunol. 2005;23:387-414.

265. Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM. CATERPILLERs, pyrin and hereditary immunological disorders. Nat Rev Immunol. 2006 Mar;6(3):183-95.

266. Török HP, Glas J, Lohse P, Folwaczny C. Alterations of the CARD15/NOD2 gene and the impact on management and treatment of Crohn's disease patients. Dig Dis. 2003;21(4):339-45.

267. Török HP, Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. Clin Immunol. 2004 Jul;112(1):85-91.

268. Török HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Müller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brunnler G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkühn T, Folwaczny C. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. Gut. 2005 Oct;54(10):1421-7.

269. Trallori G, Palli D, Saieva C, Bardazzi G, Bonanomi AG, d'Albasio G, Galli M, Vannozzi G, Milla M, Tarantino O, Renai F, Messori A, Amorosi A, Pacini F, Morettini A. A population-based study of inflammatory bowel disease in Florence over 15 years (1978-92). Scand J Gastroenterol. 1996 Sep;31(9):892-9.

270. Tsang P, Rotterdam H. Biopsy diagnosis of colitis: possibilities and pitfalls. Am J Surg Pathol. 1999 Apr;23(4):423-30.

271. 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. 1988 Jul;29(7):990-6.

272. van Heel DA, Dechairo BM, Dawson G, McGovern DP, Negoro K, Carey AH, Cardon LR, Mackay I, Jewell DP, Lench NJ. The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants. Hum Mol Genet. 2003 Oct 15;12(20):2569-75.

273. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. Lancet. 2005 May 21-27;365(9473):1794-6.

274. Vavassori P, Borgiani P, Biancone L, D'Apice MR, Blanco Gdel V, Vallo L, De Nigris F, Monteleone I, Monteleone G, Pallone F, Novelli G. CARD15 mutation analysis in an Italian population: Leu1007fsinsC but neither Arg702Trp nor Gly908Arg mutations are associated with Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis. 2004 Mar;10(2):116-21.

275. Vermeire S, Reinisch W, Joossens S et al. NOD2/CARD15 genotyping in patients with indeterminate colitis (IC): helpful towards definitive diagnosis? Gastroenterology. Supplement 2002a A:M1416.

276. Vermeire S, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD. CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. Am J Hum Genet. 2002b Jul71(1):74-83.

277. Vermeire S, Louis E, Rutgeerts P, De Vos M, Van Gossum A, Belaiche J, Pescatore P, Fiasse R, Pelckmans P, Vlietinck R, Merlin F, Zouali H, Thomas G, Colombel JF, Hugot JP; Belgian Group of Infliximab Expanded Access Program and Fondation Jean Dausset CEPH, Paris, France. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. Gastroenterology. 2002c Jul;123(1):106-11.

278. Vermeire S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2004a Jun;18(3):569-75.

279. Vermeire S, Rutgeerts P, Van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, Peeters M, Vlietinck R. Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity, and epistasis. Gut. 2004b Jul;53(7):980-6.

280. Vermeire S and Rutgeerts P. Current status of genetics research in inflammatory bowel disease. Genes Immun. 2005 Dec;6(8):637-45.

281. Vestergaard P, Krogh K, Rejnmark L, Laurberg S, Mosekilde L. Fracture risk is increased in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. Gut. 2000 Feb;46(2):176-81.

282. Watanabe H, Narasaka T, Uezu T. Colonfiberoscopy. Stomach, Intestine. 1971;6:1333-6.

283. Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. Nat Immunol 2004 Aug;5(8):800-8.

284. Waye JD. The role of colonoscopy in the differential diagnosis of inflammatory bowel disease. Gastrointest Endosc. 1977 Feb;23(3):150-4.

285. Waye JD. Endoscopy in inflammatory bowel disease: indications and differential diagnosis. Med Clin North Am. 1990 Jan;74(1):51-65.

286. Weedon DD, Shorter RG, Ilstrup DM, Huizenga KA, Taylor WF. Crohn's disease and cancer. N Engl J Med. 1973 Nov 22;289(21):1099-103.

287. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schaffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schroder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. Gut. 2004 Nov;53(11):1658-64.

288. Weterman IT, Biemond I, Pena AS. Mortality and causes of death in Crohn's disease. Review of 50 years' experience in Leiden University Hospital. Gut. 1990 Dec;31(12):1387-90.

289. Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD. Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. Inflamm Bowel Dis 2002 Nov;8(6):375-381.

290. Winslet MC, Allan A, Poxon V, Youngs D, Keighley MR. Faecal diversion for Crohn's colitis: a model to study the role of the faecal stream in the inflammatory process. Gut. 1994 Feb;35(2):236-42.

291. Wordsworth P. Genes in the spondyloarthropathies. Rheum Dis Clin North Am. 1998 Nov;24(4):845-63.

292. Yang H, Rotter JI. The genetic background of inflammatory bowel disease. Hepatogastroenterology. 2000 Jan-Feb;47(31):5-14.

293. Yang H, Taylor KD, Rotter JI. Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. Mol Genet Metab. 2001 Sep-Oct;74(1-2):1-21.

294. Yantiss RK, Odze RD. Diagnostic difficulties in inflammatory bowel disease pathology. Histopathology. 2006 Jan;48(2):116-32.

295. Yoshitake S, Kimura A, Okada M, Yao T, Sasazuki T. HLA class II alleles in Japanese patients with inflammatory bowel disease. Tissue Antigens. 1999 Apr;53(4 Pt 1):350-8.

296. Zouali H, Lesage S, Merlin F, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Christensen S, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Chamaillard M, Thomas G, Hugot JP; EPWG group; EPIMAD group. CARD4/NOD1 is not involved in inflammatory bowel disease. Gut. 2003 Jan;52(1):71-4.

7. Danksagung

Begonnen hat diese Arbeit, als ich mich auf der Suche nach einer Doktorarbeit an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Ochsenkühn wandte, den Leiter der Arbeitsgruppe „Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen“ der II. Medizinischen Klinik am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München, der mir die Mitarbeit in seiner Forschungsgruppe in Kooperation mit dem Leiter der Arbeitsgruppe Molekularbiologie am Institut für Klinische Chemie - Großhadern, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Peter Lohse, anbot. In der Medizinischen Klinik II - Großhadern absolvierte ich dann auch ein Tertial des Praktischen Jahres unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Göke, dem Direktor der Klinik, wobei mich die Verbindung zwischen Patientenversorgung und klinisch-wissenschaftlicher Forschung immer mehr faszinierte. Herrn Prof. Dr. med. Burkhard Göke und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Ochsenkühn gilt deshalb mein herzlicher Dank dafür, dass sie mir die Mitarbeit ermöglicht haben und mir wohlwollende Unterstützung gewährten.

Die mit viel Mühe und Zeitaufwand verbundene Betreuung und Korrektur meiner Arbeit hat Prof. Dr. med. Peter Lohse übernommen. Für seine große Hilfe und Beratung möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem Direktor des Institutes für Klinische Chemie, Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Dietrich Seidel, der mir die Einreichung meiner Arbeit an seinem Institut ermöglichte.

Des Weiteren möchte ich dem gesamten Team des CED-Zentrums und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der II. Medizinischen Klinik sowie des Institutes für Klinische Chemie danken. Insbesondere gilt mein herzlicher Dank Herrn Priv.- Doz. Dr. med. Stephan Brand, Frau Dr. med. Julia Seiderer und Frau Dr. med. Cornelia Tillack, unserer medizinischen Datenassistentin Frau Simone Pfennig und der Schwester Frau Caroline Wolf.

Ich bedanke mich auch für die große Hilfe der Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe Molekularbiologie, Frau Pia Lohse, Frau Heike Rübsamen und Frau Gabriele Simon.

Was ich in den Jahren meiner Arbeit an Hilfe und Beratung empfangen habe, war nicht nur wichtig für meine erfolgreiche Arbeit. Ich durfte auch erfahren, wie unverzichtbar die kollegiale und vertrauensvolle Zusammenarbeit für ein erfolgreiches Wirken im ärztlichen und im medizinisch-wissenschaftlichen Arbeitsfeld ist.

8. Veröffentlichungen

Veröffentlichungen in Zeitschriften mit "peer review":

Auernhammer CJ, Zitzmann K, Schnitzler F, Seiderer J, Lohse P, Vlotides G, Engelhardt D, Sackmann M, Goke B, Ochsenkuhn T. Role of the intracellular receptor domain of gp130 (exon 17) in human inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol 2005; 11: 1196-9.

Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T. Infliximab zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen. Deutsches Ärzteblatt 2005 Mar; 102: A-828 / B-698 / C-651.

Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn 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 2005; 11: 645-52.

Török HP, Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Müller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brunnler G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkühn T, Folwaczny C. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. Gut 2005; 54: 1421-7.

Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn 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 2006; 101: 99-106.

Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Hofbauer K, Seiderer J, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Eight novel CARD15 variants detected by DNA sequence analysis of the CARD15 gene in 111 patients with inflammatory bowel disease. Immunogenetics 2006; 58: 99-106.

Glas J, Török HP, Tonenchi L, Müller-Myhsok B, Mussack T, Wetzke M, Klein W, Epplen JT, Griga T, Schiemann U, Lohse P, Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Ochsenkühn T, Folwaczny M, Folwaczny C. Role of the NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism in IBD and potential interactions with polymorphisms in the CARD15/NOD2, IKBL, and IL-1RN genes. Inflamm Bowel Dis 2006; 12: 606-611.

Seiderer J, Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Herrmann K, Hofbauer K, Dambacher J, Tillack C, Sackmann M, Göke B, Lohse P & Ochsenkühn 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 re-stenosis. Scand J Gastroenterol 2006 Dec;41(12):1421-32.

Seiderer J, Brand S, Herrmann K, Schnitzler F, Hatz R, Crispin A, Pfennig S, Schönberg S, Göke B, Lohse P and Ochsenkühn T. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice. Results of a prospective study. Inflamm Bowel Dis 2006 Dec;12(12):1114-21.

Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, Sisic Z, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Konrad A, Tillack C, Otte JM, Diebold J, Göke B, Ochsenkühn 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 2007 Jan;13(1):71-82.

Abstrakte:

Schnitzler F, Lohse P, Sackmann M, Göke B, Ochsenkühn T. Frequency of three common CARD15/NOD2 gene mutations in patients from the "Inflammatory bowel disease" clinics at the Großhadern Hospital. Poster Nr. 33, Posterstipendium, NGFN Symposium "Genomics of Chronic Inflammatory Disorders", Kiel 2002.

Schnitzler F, Lohse P, Sackmann M, Göke B, Ochsenkühn T. Häufigkeit der drei wichtigsten CARD15/NOD2-Gen-Mutationen bei Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten der Ambulanz für „Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen" am Universitätsklinikum Großhadern. Vortrag V6, XXX. Kongreß der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e. V., Bad Kissingen 2002.

Schnitzler F, Lohse P, Sackmann M, Göke B, Ochsenkühn T. Frequency of three common CARD15/NOD2 mutations in a Munich cohort of IBD patients. Gut 2002; 51 (Suppl III) A130.

Schnitzler F, Lohse P, Sackmann M, Göke B, Ochsenkühn T. Frequency of three common Card15/Nod2 gene mutations and genotype/phenotype correlation in a single center German IBD cohort. Poster M1578, Digestive Disease Week 2003 der American Gastroenterological Association, Orlando 2003.

Schnitzler F, Lohse P, Brand S, Seiderer J, Herrmann K, Reiser M, Göke B, Ochsenkühn T. Homozygosity for the 3020insC mutation of the CARD15/NOD2 gene is a strong predictor for a very severe subtype of Crohn's disease characterized by long-segment bulky fibrostenosis of the terminal ileum. Poster Nr. 64: M350, Falk Symposium No 140, Dubrovnik 2004.

Schnitzler F, Lohse P, Seiderer J, Brand S, Herrmann K, Tillack C, Göke B, Ochesnkühn T. Homozygote Träger der C-Insertion 3020insC des CARD15 Gens bilden einen eigenen Subtyp der Erkrankung des Morbus Crohn mit klinisch sehr schwerem Verlauf und langen entzündlichen Stenosen im terminalen Ileum. Poster Nr. 103P, 59. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten DGVS, Leipzig 2004.

Brand S, Staudinger T, Hofbauer K, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Der TLR4-Asp299Gly-Polymorphismus ist mit Morbus Crohn assoziiert. Poster Nr. 087P, 59. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten DGVS, Leipzig 2004.

Schnitzler F, Lohse P, Seiderer J, Brand S, Herrmann K, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T. Homozygosity fort he 3020insC mutation of the CARD15/NOD2 gene is a strong predictor for a very severe subtype of Crohn's disease characterized by long-segment bulky fibrosteonoses of the terminal ileum. Gut 2004; 53 (Suppl VI) A142. "Best abstract", Posterstipendium.

Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad C, Hölzel D, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. The role of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms in Crohn's disease. Gut 2004; 53 (Suppl VI) A146 "Best abstract".

Schnitzler F, Lohse P, Seiderer J, Brand S, Herrmann K, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T. Homozygote Träger der C-Insertion 3020insC des CARD15 Gens bilden einen eigenen Subtyp der Erkrankung des Morbus Crohn mit klinisch sehr schwerem Verlauf und langen entzündlichen Stenosen im terminalen Ileum. Poster Nr. 23, XXXII. Kongreß der Gesellschaft für Gastroenterologie in Bayern e. V., Garmisch-Patenkirchen 2004.

Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Conrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease phenotype. Gastroenterolgy 2005; Vol. 128 (Suppl II): W1625.

Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crispin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T. The role of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and the phenotype of Crohn's disease. Gastroenterolgy 2005; Vol. 128 (Suppl II): T1019.

Dambacher J, Hofbauer K, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T, Brand S. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease phenotype. Can J Gastroenterol 2005; Vol 19 (Suppl B) PP10.

Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Hofbauer K, Seiderer J, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Detection of novel CARD15 mutations in IBD patients with a severe disease phenotype. Poster T2003, Digestive Disease Week 2006 der American Gastroenterological Association, Los Angeles 2006.

Thalmaier D, Dambacher J, Konrad A, Schachinger V, Pfennig S, Schnitzler F, Staudinger T, Hofbauer K, Otte JM, Seiderer J, Tillack C, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Brand S. The 1059G/C polymorphism in the CRP gene is associated with involvement of the terminal ileum in patients with Crohn's disease. Poster T1996, Digestive Disease Week 2006 der American Gastroenterological Association, Los Angeles 2006.

Dambacher J, Sisic Z, Staudinger T, Pfennig S, Schnitzler F, Hofbauer K, Otte JM, Seiderer J, Tillack C, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T, Brand S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement in Crohn's disease. Poster M1739, Digestive Disease Week 2006 der American Gastroenterological Association, Los Angeles 2006.

9. Lebenslauf

Name:	Fabian Dominikus Oskar Schnitzler
Anschrift:	Am Oberanger 14 85221 Dachau
Geburtsdatum:	30.07.1976
Geburtsort:	Dachau
Eltern:	Dr. med. Michael Schnitzler, Facharzt für Orthopädie, Sportmedizin und Sozialmedizin
	Dipl.-Psych. Dr. med. Ursula Schnitzler Praktische Ärztin, Diplom-Psychologin
Geschwister:	Tobias Schnitzler, Student der Humanmedizin
Schulbildung:	
1983-1987:	Grundschule Karlsfeld-München
1987-1996:	Ignatz-Taschner-Gymnasium Dachau Juli 1996: Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Wehrdienst:	
Juli 1997-April 1998:	Wehrdienst: Amt für Wehrgeophysik der Luftwaffe – Geologische Beratungsstelle, Fürstenfeldbruck
Studium:	
WS 1996/1997:	Studium der Geologie an der TU München
SS 1998:	Studium der Geologie an der TU München
September 1998-August 1999:	Ausbildung zum Rettungsassistenten an der Wallner-Schule München Theoretischer Teil
August 1999:	Beginn des Praktischen Teils zur Ausbildung zum Rettungsassistenten
1999-2005:	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
November 2005:	Erhalt eines Forschungsstipendiums der „European Crohn's and Colitis Organisation“ (ECCO)
Februar 2006:	Erhalt eines Forschungsstipendiums des Universitätsklinikums Gasthuisberg, Leuven, Belgien
seit Februar 2006:	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe „Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen“ bei Professor Paul Rutgeerts und Professor Séverine Vermeire in der Abteilung für Gastroenterologie des Universitätsklinikums Leuven in Belgien