

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke**

**DIE ROLLE VON POLYMORPHISMEN DES FRACTALKIN-REZEPTORS  
CX3CR1 BEIM MORBUS CROHN**

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

vorgelegt von  
Katrin Hofbauer  
aus Trostberg

2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Diepolder

Mitberichterstatter: PD. Dr. Andreas Eigler

Prof. Dr. Stefan Endres

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: PD. Dr. Stephan Brand

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2009

**meinen Eltern**

## **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
1.1	Historische Entwicklung und Epidemiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)	7
1.2.	Die Pathogenese von CED	8
1.2.1	Genetische Faktoren bei der CED-Entstehung	8
1.2.2	Das intestinale Immunsystem	11
1.2.3	Die intestinale bakterielle Flora	13
1.2.4	Umweltfaktoren bei der CED-Pathogenese	14
1.3	Pathologie und Klinik von CED	15
1.3.1	Gastrointestinaler Befall	15
1.3.2	Extraintestinale Manifestationen	17
1.4	Diagnosestellung von CED	18
1.5	Therapie von CED	19
1.6	Chemokine	20
1.6.1	Chemokin-Klassifizierung	20
1.6.2	Chemokin-Rezeptoren	21
1.6.3	Funktionen von Chemokinen	23
1.6.4	Chemokine bei CED	24
1.6.5	CX3CL1/Fractalkin	25
1.7	Zielsetzung	27

<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>28</b>
2.1	Patienten und Probanden	28
2.2	Material	30
2.2.1	Geräte	30
2.2.2	Verbrauchsmaterialien	30
2.2.3	Chemikalien	31
2.2.3.1	Präparation genomischer DNA	31
2.2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
2.2.3.3	Präzipitation von DNA	31
2.2.3.4	Restriktionsverdau	32
2.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	32
2.3	Methoden	33
2.3.1	Präparation genomischer DNA	33
2.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
2.3.2.1	PCR-Protokoll	34
2.3.2.2	PCR-Bedingungen für CX3CR1	35
2.3.3	Positiv- und Negativkontrolle	35
2.3.4	Präzipitation von DNA	36
2.3.5	Restriktionsverdau	36
2.3.5.1	Restriktionsenzym Acl I	36
2.3.5.2	Restriktionsenzym HpyCH4 III	37
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese der Restriktionsverdau-Produkte	38
2.4	Statistische Auswertung	38

<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	39
3.1	Resultate des Restriktionsverdaus	39
3.2	Vergleich mit dem Kontrollkollektiv	41
3.3	Korrelation des Genotyps mit phänotypischen Merkmalen	45
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	50
4.1	Phänotypische Auswirkungen der CX3CR1-Polymorphismen	50
4.2	Limitationen der Vienna-Klassifikation bei der Phänotypisierung von M. Crohn-Patienten	51
4.3	Die Rolle des Fractalkin-Rezeptors bei der Phagozytosefunktion dendritischer Zellen	54
4.4	Intestinale bakterielle Clearance als Pathogenese-Faktor	54
4.5	Veränderte Rezeptorfunktion durch CX3CR1-Polymorphismen	55
4.6	Bedeutung von CX3CR1-Polymorphismen bei anderen Erkrankungen	57
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	59
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	61
6.1	Literaturverzeichnis	61
6.2	Abkürzungsverzeichnis	69
6.3	Abbildungsverzeichnis	71
6.4	Tabellenverzeichnis	72
6.5	Danksagung	74
6.6	Lebenslauf	75

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Historische Entwicklung und Epidemiologie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)**

Unter „chronisch entzündlichen Darmerkrankungen“ (= CED; engl.: *inflammatory bowel disease* = IBD) versteht man idiopathische und chronische Entzündungen des Darms. Die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn sind die beiden Hauptformen von CED (Siegmond B., Zeitz M. 2005). Eine weitere Einteilung in die so genannte Colitis indeterminata kann erfolgen, wenn es sich um eine CED handelt, aber keine exakte Zuordnung zu einer der beiden Gruppen erfolgen kann. In dieser Arbeit wird in erster Linie der M. Crohn behandelt. Eine kurze Gegenüberstellung zur Colitis ulcerosa erfolgt aber bei der Darstellung klinisch-pathologischer Charakteristika.

Der M. Crohn wurde nach Burril B. Crohn benannt, der 1932 zusammen mit seinen Kollegen L. Ginzburg und G. Oppenheimer eine nicht-tuberkulöse Ileitis terminalis beschrieb, die sich durch Diarrhöen, Unterbauchbeschwerden, Fieber, Gewichtsverlust, Anämien, Obstruktionen und Resistenzen bei der Palpation äußerte (Crohn B. et al. 1932).

Jedoch waren auch schon zuvor Beschreibungen von Patienten bekannt, die vermutlich unter M. Crohn oder Colitis ulcerosa litten. Autopsieberichte von Wilhelm Fabry von 1612 könnten Befunden eines M. Crohn entsprechen, und Beschreibungen von T. K. Dalziel et al. über eine entzündliche, granulomatöse Erkrankung des terminalen Ileums mit nachfolgenden Strikturen ähneln sehr dem heutigen pathologischen Bild (Dalziel T. 1913, Kirsner J. B. 1988).

In unseren Breiten wird für M. Crohn eine Inzidenz von 5,6/100 000 und eine Prävalenz von 1/500 – 1/800 angegeben (Shivananda S. et al. 1996, Timmer A. et al. 1999). Weltweit betrachtet, gibt es allerdings beträchtliche regionale und ethnische Unterschiede. Eine Studie, die zwischen 1968 und 1983 an schottischen Kindern durchgeführt wurde, ergab generell eine Zunahme der Inzidenz. Es wurde hier ein Anstieg auf das Dreifache von 6,6/ 1 000 000 auf 22,9/1 000 000 beobachtet (Barton J. R. et al. 1989).

M. Crohn kann in jeder Altersklasse auftreten. Es gibt allerdings Hinweise auf einen ersten Erkrankungsgipfel zwischen 20 und 40 Jahren. Kontrovers wird ein zweiter Gipfel jenseits von 60 Jahren diskutiert (Ekbohm A. 2004).

## **1.2 Die Pathogenese von CED**

Die Ursachen für die Entstehung des M. Crohn sind auch heute noch nicht vollständig geklärt. Allerdings haben sich in den letzten Jahrzehnten einige neue Aspekte ergeben, die zumindest teilweisen Aufschluss über die Pathogenese bringen. Man geht davon aus, dass die Entwicklung des M. Crohn ein Zusammenspiel aus genetischen und immunologischen Faktoren sowie Umwelteinflüssen ist. Es wird vermutet, dass es bei genetisch prädisponierten Personen zu einer überschießenden Reaktion des intestinalen Immunsystems kommt, die durch die Anwesenheit der normalen Darmflora getriggert wird. Als Auslöser hierfür werden Defekte in der Schutzfunktion des Mukosaepithels, aber auch des Immunsystems selbst diskutiert (Podolsky D. K. 2002, Shanahan F. 2002).

Gewisse Erreger, wie z. B. das Masernvirus oder Mykobakterium paratuberculosis, werden auch verdächtigt, einen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen zu haben. Allerdings fielen die Ergebnisse in entsprechenden Versuchen sehr unterschiedlich aus (Fiocchi C. 1998).

### **1.2.1 Genetische Faktoren bei der CED-Entstehung**

In den letzten Jahren hatten es sich mehrere Studien als Ziel gesetzt, den genetischen Einfluss bei der Pathogenese des M. Crohn näher zu untersuchen. Man fand heraus, dass Inzidenz und Prävalenz in verschiedenen Bevölkerungen sehr unterschiedlich sind. Innerhalb der weißen Bevölkerung sind höhere Erkrankungszahlen zu finden, als bei der schwarzen oder asiatischen Bevölkerung. Die Menschen jüdischer Abstammung, hier vor allem die Ashkenazi-Juden, zeigen eine 2- bis 4-fach erhöhte Prävalenz im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppen (Ahmad T. et al. 2001).

Zum anderen konnte eine familiäre Häufung von CED beobachtet werden. Bei Verwandten ersten Grades wurde festgestellt, dass das Risiko zu erkranken, 4- bis 20-mal so hoch ist, wie bei der Normalbevölkerung. Vor allem bei monozygoten Zwillingen fand sich eine starke Konkordanz von bis zu 45 % (Tysk C. et al. 1988). Eine rein genetische Disposition konnte jedoch nicht bewiesen



werden. Der Einfluss anderer Komponenten zeigt, dass die Genese des M. Crohn multifaktoriell bedingt ist.

Genorte, die wahrscheinlich mit M. Crohn in Verbindung stehen, zeigt Tabelle 1:

Locus	Chromosom	Suszeptibilitätsgen	Assoziierte Erkrankung	Wichtige Publikationen
IBD1	16q12	<i>NOD2 /CARD15</i>	M. Crohn	Hugot <i>Nature</i> 2001 Cho <i>Nature</i> 2001 Hampe <i>Lancet</i> 2001 Seiderer/Brand <i>Scand. J. Gastro</i> 2006
IBD2	12p13.2-q24.1	unbekannt	Colitis ulcerosa	Santsangi <i>Nat Gen</i> 1996 Duerr <i>AJHG</i> 1998 IBD Consort <i>AJHG</i> 2001
IBD3	6p	unbekannt	CED	Hampe <i>AJHG</i> 1999 Decjaorp <i>EKJG</i> 2001
IBD4	14q11/12	unbekannt	M. Crohn	Mah <i>IBD</i> 1999 Duerr <i>AJHG</i> 2000
IBD5	5q31-33	<i>SLC22A4/A5</i>	M. Crohn	Rioux <i>AJHG</i> 2000 Rioux <i>Nat Gen</i> 2001 Török/Brand <i>Gut</i> 2005
IBD6	19p13	unbekannt	CED	Rioux <i>AJHG</i> 2000
IBD7	1p36	unbekannt	CED	Cho <i>PNAS</i> 1998 Cho <i>Hum Mol Gen</i> 2000
IBD8	16p12	unbekannt	M. Crohn	Satsangi <i>Nat Genet</i> 1996
IBD9	3p26	unbekannt	CED	Satsangi <i>Nat Genet</i> 1996

**Tab. 1:** Mit Colitis ulcerosa und M. Crohn assoziierte genetische Risikomarker.  
(aus Göke, *Beglinger: Gastroenterologie systematisch*. 2. Auflage- Bremen: UNI-MED 2007).

Die bisher umfangreichsten Untersuchungen wurden am Chromosom 16 (IBD1) durchgeführt. Hier konnte das Gen *NOD2/CARD15* identifiziert werden, welches ein zytoplasmatisches Protein kodiert, das vor allem in Makrophagen auftritt (Ahmad T. et al. 2002, Cuthbert A. P. et al. 2002, Lesage S. et al. 2002).

Eine intensivere Analyse ergab, dass auf diesem Chromosom Apoptosegene (*CARD*-Domäne) und Nukleotidbindungsstellen (*NOD*-Domäne) kodiert werden. Außerdem wurde eine Wiederholung von 10 Leucin-Aminosäuren am Carboxy-Ende gefunden. Mutationen in dieser Leucin-reichen Region (LRR) wurden bei 8% der Patienten mit positiver Familienanamnese nachgewiesen. Bei homozygoten Trägern wurde festgestellt, dass das Risiko zu erkranken, bis um den Faktor 40 zunehmen kann. Aber auch bei heterozygoten Merkmalsträgern ist das Erkrankungsrisiko erhöht (Elson C. O. 2002).

Das *CARD15*-Gen umfasst 11 konstante und wahlweise ein zwölftes Exon, welches sich am 5'-Ende befindet. Bei Patienten mit M. Crohn konnten drei

Mutationen des *CARD15*-Gens im Leucin-reichen Gebiet verifiziert werden, die zu einem Aminosäureaustausch führen: R702W in Exon 4 und G908R in Exon 8. In Exon 11 bewirkt die Insertionsmutation 3020insC oder 1007fs eine Verschiebung des Leserahmens (*frame shift*, 1007fs), was zur Kürzung des resultierenden Proteins führt. Weitere Variationen, vor allem in Exon 4, werden ebenfalls beschrieben (Schreiber S. et al. 2004, Schnitzler F. et al. 2006). Bisherige Studien sprechen dafür, dass *CARD15/NOD2* eine Rolle bei der Zellapoptose spielt. Die Leucin-reiche Region ist wichtig für die Identifizierung mikrobieller Produkte, wie z.B. Peptidoglykane. Genauere Untersuchungen ergaben, dass *CARD15/NOD2* einen intrazellulären Rezeptor für Muramyl-dipeptid (MDP) kodiert (Girardin S. E. et al. 2003, Inohara N. et al. 2004). Dieses Produkt befindet sich in der Zellwand grampositiver und -negativer Bakterien. Normalerweise führt eine Bindung von Endotoxinen an den Rezeptor zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, der die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) fördert. Bei Patienten mit der *CARD15*-Mutation 3020insC (1007fs) bewirkt MDP keine Aktivierung einer Signalkaskade („*loss of function*“) (Barnich N. et al. 2005). Aus diesen Resultaten wurde geschlossen, dass *CARD15/NOD2* physiologischerweise im intestinalen Immunsystem einen gegenregulatorischen, antiinflammatorischen Effekt ausübt. Durch die Erkennung mikrobieller Produkte, gehört *CARD15/NOD2* somit zur Gruppe der „*pattern-recognition*“ Rezeptoren, zu der auch Toll-Like-Rezeptoren (1-11) zählen, die extrazellulär lokalisiert sind und dort Lipopolysaccharide (*TLR4*), bakterielles Flagellin (*TLR5*) und CpG-Nukleotide (*TLR9*) erkennen (Brand S. et al. 2005). Der Einfluss dieser Rezeptoren auf den M. Crohn wurde bereits ausführlich untersucht (Elson C. O. 2002). In kürzlich publizierten genomweiten Assoziationsstudien wurden eine Reihe weiterer Suszeptibilitätsgene für den Morbus Crohn identifiziert, die in Tabelle 2 dargestellt sind (Cho J.H. et al. 2007, Duerr R.H. et al. 2006, Hampe J. et al. 2007).

Gen oder Locus	Chromosom	Funktion/Gene im betroffenen Abschnitt	Assoziation
<i>NOD2</i>	16q12	Intrazellulärer Sensor für Peptidoglykane	Morbus Crohn
<i>IL23R</i>	1p31	IL-23-Rezeptor	Morbus Crohn Colitis ulcerosa
<i>ATG16L1</i>	2q37	Autophagozytose	Morbus Crohn
<i>Intergenic region</i>	5p13	?PTGER4; CARD6	Morbus Crohn
<i>IBD5</i>	5q31	?SLC22A4; ?SLC22A5 ?IRF1	Morbus Crohn Colitis ulcerosa
<i>MHC region</i>	6p21	MHC-Komplex	Morbus Crohn Colitis ulcerosa
<i>PTPN2</i>	18p11	T-Zell-Protein-Thyrosin-Phosphatase	Morbus Crohn
<i>IL12B</i>	5q33	Interleukin-12/23 p40-Untereinheit	Morbus Crohn
<i>NKX2-3 region</i>	10q24	Immunentwicklung im GI-Trakt	Morbus Crohn
<i>Intergenic region</i>	10q21	?ZNF365; ?EGR2	Morbus Crohn
<i>Gene-rich region</i>	3p21	viele	Morbus Crohn
<i>IRGM gene region</i>	5q33	Autophagozytose	Morbus Crohn

**Tab. 2:** Zusammenfassung weiterer Suszeptibilitätsgene bei Morbus Crohn (Cho J.H. et al. 2007).

### 1.2.2 Das intestinale Immunsystem

Eine entscheidende Komponente, die ganz wesentlich zur Krankheitsentstehung beiträgt, ist die Fehlfunktion des Immunsystems. Es werden sowohl dessen übermäßige Aktivierung und fehlende Gegenregulierungsmechanismen diskutiert, als auch ein Defekt der Schutzfunktion der Darmschleimhaut (Mashimo H. et al. 1996, Schmitz H. et al. 1998).

Im Darm findet ein komplexes Zusammenspiel der residenten Flora, des Darmepithels, von Zytokinen, Lymphozyten und dendritischen Zellen statt, das normalerweise ein ausgeglichenes Verhältnis hat. Der Darm ist immer in „Alarmbereitschaft“, toleriert aber die eigenen Darmbakterien. Bei der

Pathogenese des M. Crohn wird eine überschießende Immunantwort durch T-Helferzellen 1 (TH1-Zellen) angenommen. Die Differenzierung zu diesen Zellen findet statt, wenn T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen korrespondieren, die aufgrund von Kontakt zu Bakterien IL-12 produzieren. Die Folge der TH1-Zellen-Aktivierung ist eine Freisetzung der inflammatorischen Mediatoren TNF- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$  sowie Interleukin (IL)-6 und IL-1 $\beta$  (Shanahan F. 2002). Durch diese proinflammatorischen Zytokine kommt es u. a. zur Aktivierung von Matrix-Metallo-proteinasen, die das Gewebe angreifen. Zusätzlich wird die Mikrozirkulation negativ beeinflusst. Ein weiterer Effekt ist die verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen und die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Alle diese Faktoren tragen zu einer Verstärkung des Entzündungsprozesses bei, der schließlich zur Gewebeerstörung führt (Shanahan F. 2002).

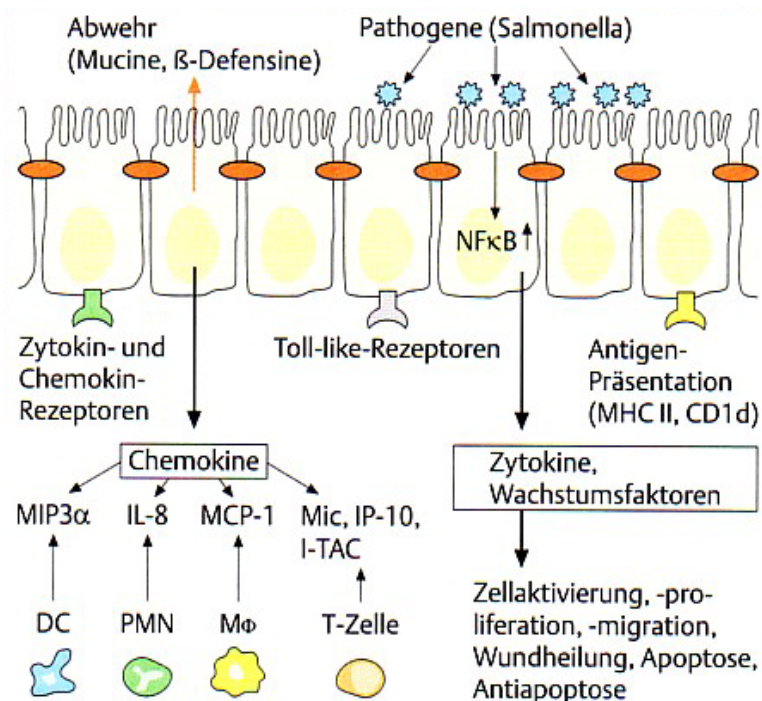
Vor kurzem wurden auch TH17-Zellen als Faktor bei der Pathogenese des M. Crohn identifiziert. Diese Zellen exprimieren IL-23R an ihrer Oberfläche und produzieren unter dem Einfluss von IL-23 die proinflammatorischen Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-22 und IL-26 (Cho J.H. et al. 2007, Elson C.O. et al. 2007, Yen D. et al. 2006). Bestimmte Polymorphismen im IL-23-Rezeptor (Tab. 2) sind mit M. Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert (Duerr R.H. 2006, Glas J. 2007).

Normalerweise werden die aktivierten T-Zellen durch zwei Prozesse kontrolliert, die beide beim M. Crohn gestört zu sein scheinen. Zum einen existiert ein Zusammenspiel von Effektor- und Suppressorzellen, die eine Immunantwort im Gleichgewicht halten. Die Suppressorzellen, von denen man außerdem vermutet, dass sie autoimmune Reaktionen verhindern, benötigen die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  und das CTLA-4-Antigen. Durch die TH1-Zellen kommt es zur Verminderung der Suppressorzellen. Der zweite Weg, die T-Zellen zu überwachen, endet in der Apoptose. Man nimmt an, dass dieser Mechanismus fehlerhaft ist und die Zellen somit die Entzündung aufrechterhalten (Shanahan F. 2002).

### 1.2.3 Die intestinale bakterielle Flora

Auch die Darmflora spielt bei der Pathogenese des M. Crohn eine wichtige Rolle. In Studien fand sich bei Patienten mit aktivem M. Crohn eine signifikante Verminderung von anaeroben Bakterien und Lactobacillen (Fiocchi C. 1998). Weiterhin wurde in Tierversuchen der Einfluss der Darmflora untersucht: Bei IL-10-Knockout-Mäusen, die in keimfreier Umgebung gehalten wurden, trat keine Kolitis auf. Bei den Vergleichstieren kam es im Gegensatz dazu zu einem sehr schnellen Krankheitsverlauf. Außerdem konnte eine frühe Behandlung der IL-10-Knockout-Mäuse mit Antibiotika der späteren Entwicklung einer Kolitis vorbeugen (Madsen K. L. 2001).

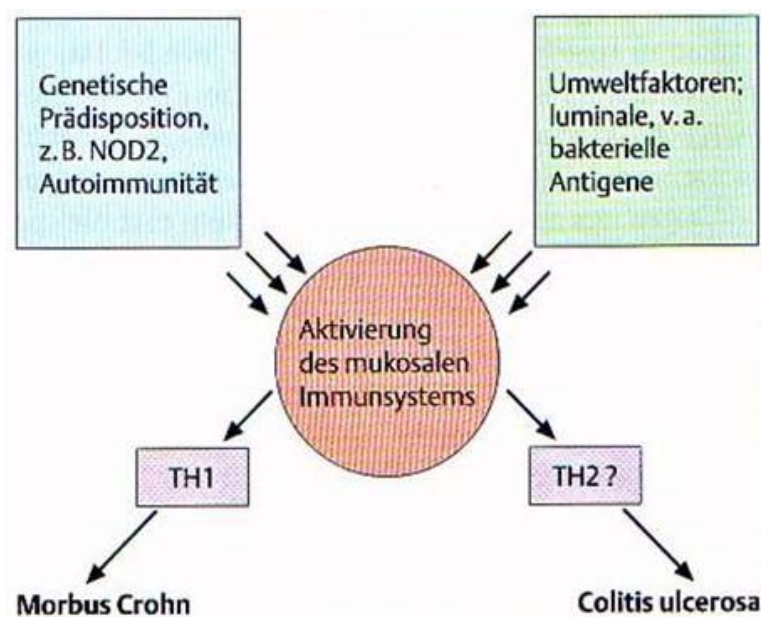
Die komplexen Vorgänge bei Kontakt der intestinalen Epithelzellen mit Pathogenen zeigt die folgende Abbildung.



**Abb. 1:** Immunologische Funktionen intestinaler Epithelzellen. DC = Dendritische Zellen, PMN = neutrophile Granulozyten, M $\phi$  = Makrophagen (aus Hoffmann, Kroesen, Klump, „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“, 2004 Georg Thieme Verlag, S. 51).

### 1.2.4 Umweltfaktoren bei der CED-Pathogenese

Umweltfaktoren beeinflussen ebenfalls die Pathogenese des M. Crohn. Zu diesem Schluss kam man, da zum einen die Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen unter 50% lag und bei gleichen ethnischen Gruppen, die in verschiedenen Regionen lebten, ein unterschiedliches Krankheitsrisiko zu finden war (Shanahan F. 2002). Umweltfaktoren, die in nähere Betrachtung gerückt sind, umfassen unter anderem pränatale Ereignisse, Stillen, Erkrankungen in der Kindheit, Antikontrazeptiva, u.a. (Koutrobakis I. et al. 1996). Aber auch das Rauchen und der Gebrauch von nichtsteroidalen Antiphlogistika scheinen einen negativen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen zu haben (Bridger S. et al. 2002, Evans J. M. et al. 1997). Während das Rauchen bei den M. Crohn-Patienten zu einem zweifach erhöhten Krankheitsrisiko führt, scheint es bei der Entwicklung einer Colitis ulcerosa eher protektiv zu wirken.



**Abb. 2:** Zusammenspiel der Faktoren bei der Pathogenese der CED (aus Hoffmann, Kroesen, Klump, „Chronisch entzündliche Darmerkrankungen“, 2004 Georg Thieme Verlag, S.34).

### 1.3 Pathologie und Klinik von CED

#### 1.3.1 Gastrointestinaler Befall

Prinzipiell kann sich der M. Crohn im gesamten Gastrointestinaltrakt, vom Mund bis zum anorektalen Bereich, manifestieren. Jedoch wird eine Beteiligung des Dick- und Dünndarms am häufigsten diagnostiziert (40-55%). Ein alleiniger Befall des terminalen Ileums tritt bei 25-40% der Patienten auf (Farmer R. G. et al. 1975). Eine Zusammenfassung der wichtigsten pathologischen und klinischen Aspekte sowie eine Abgrenzung zur Colitis ulcerosa zeigt Tabelle 3.

	<b>Morbus Crohn</b>	<b>Colitis ulcerosa</b>
<b>Lokalisation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Terminales Ileum</li> <li>• Kolon</li> <li>• restlicher GI-Trakt</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kolon</li> <li>• Rektum</li> </ul>
<b>Lokalisationsmuster</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Segmentaler, diskontinuierlicher Befall</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aufsteigend kontinuierlicher Befall</li> </ul>
<b>Morphologie</b> <b>Makroskopisch</b>  <b>Mikroskopisch</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gartenschlauchstrikturen</li> <li>• Pflastersteinrelief (Nebeneinander tiefer, teils narbiger Ulzerationen und ödematöser, entzündeter Schleimhaut)</li> <li>• „skip lesions“ (Wechsel gesunder und entzündeter Bereiche)</li> <li>• Transmurale Entzündung</li> <li>• Granulome</li> <li>• Infiltrat aus plasmazellulären, granulozytären und histiozytären Zellen</li> <li>• Fibrosierung der Muscularis mucosae</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ulzerationen</li> <li>• Fibrosierung</li> <li>• Pseudopolypen</li> <li>• Verlust der Haustren</li> <li>• Abflachung der Schleimhaut</li> <li>• Meist intakte Muscularis mucosae</li> <li>• Kryptenabszesse</li> </ul>

<b>Symptome</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Wässrige Diarrhö, wenig Blut</li><li>• Schmerz (v. a. im rechten Unterbauch)</li><li>• Erbrechen, Gewichtsverlust, Fieber</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Blutig-schleimige Diarrhö</li><li>• Koliken</li></ul>
<b>Komplikationen</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Stenosen, Fisteln, Perforation, Abszesse</li><li>• Konglomerattumor</li><li>• Extraintestinale Beteiligung</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toxisches Megakolon</li><li>• Entartung</li><li>• Extraintestinale Beteiligung</li></ul>

**Tab. 3:** Gegenüberstellung von Klinik und Pathologie bei M. Crohn und Colitis ulcerosa.



### 1.3.2 Extraintestinale Manifestationen

Sowohl beim M. Crohn als auch bei der Colitis ulcerosa treten neben den Beschwerden, welche die Entzündung im Darm verursacht, auch extraintestinale Symptome auf. Begleiterkrankungen wie Gallen- und Nierensteine und nicht krankheitsspezifische Komplikationen (Amyloidose, Osteoporose, thromboembolische Ereignisse) werden hiervon abgegrenzt (Adler G. et al. 2003). Durch Malabsorptionsstörungen kann sich ein Gewichtsverlust entwickeln. Insbesondere bei Kindern kann dies eine Beeinträchtigung ihres Wachstums auslösen (Sentongo T. A. et al. 2000).

<b>Organ</b>	<b>Erkrankung</b>
<b>Auge</b>	• Episkleritis, Iritis, Iridozyklitis
<b>Haut</b>	• Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum
<b>Leber, Gallenwege</b>	• Primär sklerosierende Cholangitis
<b>Gelenke</b>	• Arthralgien, enterogene Spondylarthropathien Periphere Arthritiden
<b>Pankreas</b>	• Pankreatitis
<b>Lunge</b>	• Bronchiolitis obliterans, granulomatöse oder nichtgranulomatöse interstitielle Entzündung, Entzündung der großen Atemwege, Serositis
<b>Neurologische Manifestationen</b>	• Polyneuropathie, Polyradikulopathien, Myelopathien
<b>Blutgefäßsystem</b>	• Vaskulitiden

**Tab. 4:** Extraintestinale Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

## 1.4 Diagnosestellung von CED

Eine genaue Diagnosestellung und insbesondere die Abgrenzung der beiden CED-Hauptformen M.Crohn und Colitis ulcerosa sind vor allem für die weitergehende Therapie von großer Bedeutung. Zur Diagnostik werden verschiedene Methoden eingesetzt, wobei immer eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung am Anfang steht. Die Ergebnisse, die sich hier ergeben, können durch zusätzliche apparative Methoden, sowie Labortests ergänzt werden. Der „Goldstandard“ ist die histologische Untersuchung der endoskopisch entnommenen Biopsien.

<b>Diagnostik</b>	<b>Untersuchung</b>
<b>Radiologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrasteinlauf/ Magendarmpassage nach Sellink</li> <li>• MRT-Enteroklysma</li> </ul> ⇒ Stenosen, Fissuren, Fisteln, Wandverdickungen, Pflastersteinrelief, „skip lesions“
<b>Endoskopie mit histologischer Untersuchung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rektoskopie, Koloskopie, Ösophagogastroduodenoskopie</li> </ul> ⇒ begrenzte Ulcera, Fissuren, Strikturen, aphthoide Läsionen, Fisteln
<b>Sonographie</b>	⇒ verdickte Darmwand, Abszesse
<b>Labor</b>	⇒ BSG↑, CRP↑, Leukozyten↑, Anämie, Albumin↓, Kupfer und Zink↓, Gerinnungsstörungen, Autoantikörper: ASCA, pANCA CARD15/NOD2-Mutationen
<b>Mikrobiologie</b>	• Bakteriologische Untersuchung des Stuhls

**Tab. 5:** Diagnostische Möglichkeiten bei M. Crohn.

## 1.5 Therapie von CED

Für eine optimale Therapie sind neben der Diagnosestellung auch die Ausprägung sowie das Befallsmuster der Erkrankung, die aktuelle klinische Symptomatik, eventuelle Begleiterkrankungen und der bisherige Verlauf von großer Bedeutung. Eine kurze Zusammenfassung der aktuellen Therapieoptionen bei M. Crohn stellt Tabelle 6 dar.

Therapiemöglichkeit	Indikation
<b>Medikamentös</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Befall von Dünndarm oder rechtseitigem Kolon:</b> Budesonid*, 5-Aminosalicylsäure*</li> <li>• <b>Kolonbefall:</b> Salazosulfapyridin* oder 5-ASA* *nicht zum Remissionserhalt</li> <li>• <b>Bei schweren Verläufen:</b> systemische Steroide (keine Langzeithherapie!) Immunsuppressiva⇒Azathioprin Mercaptopurin, Methotrexat Anti-TNF-<math>\alpha</math>-Therapie⇒ Infiximab</li> <li>• <b>Antibiotika:</b> v. a. bei Verdacht auf Abszess oder Fistel⇒ Metronidazol, Ciprofloxacin</li> </ul>
<b>Operativ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elektive Eingriffe: Sparsame Resektion, Strikturoplastik, Bypassverfahren</li> <li>• Notfalleingriffe</li> </ul>
<b>Ernährung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0-Diät, parenterale Ernährung, Elementardiät</li> </ul>
<b>Psychotherapie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Supportiv oder analytisch, Selbsthilfegruppen</li> </ul>

**Tab. 6:** Therapieoptionen bei M. Crohn.

Durch das große Spektrum der an Entzündungen beteiligter Zytokine und Chemokine ergibt sich für die Zukunft ein großes, erfolgversprechendes Feld an neuen Therapieoptionen. Derzeit werden anti-entzündliche Zytokine wie IL-10, IL-

1 $\beta$  und Interferone sowie Antikörper gegen TNF - $\alpha$ , intrazelluläre Signalkaskaden, Adhäsionsmoleküle, etc. näher untersucht (Podolsky D. K. 2002).

## 1.6 Chemokine

### 1.6.1 Chemokin-Klassifizierung

Chemokine werden auch als chemotaktische Zytokine bezeichnet. Zytokine sind Mediatoren, deren Aufgabe es ist, das Immunsystem zu kontrollieren und die Kommunikation zwischen den Komponenten zu gewährleisten. Sie werden, entweder kontinuierlich nach einem endogenen Rhythmus ausgeschüttet oder ausgelöst durch Krankheiten, von bestimmten Zellen produziert. Zur Funktion der Zytokine gehört es, das Überleben, die Proliferation, die Entwicklung und die Differenzierung der Immunzellen zu koordinieren. Sie stehen in einem komplexen System miteinander in Verbindung und ergänzen sich in ihren Effekten (Feller A.C., Merz H. 2004).

Inzwischen sind über 40 Chemokine bekannt. Sie sind 8-10 kd große Proteine, die in ihrer Sequenz zu 20-70 Prozent übereinstimmen. Die „historische Einteilung“ der Chemokine wurde im Keystone Chemokine Symposium 1999 überarbeitet und erfolgt nun nach der Position ihrer Cystein-Reste am N-terminalen Ende (Zlotnik A. et al. 2000). Gemäß dieser Klassifikation ergaben sich vier verschiedene Klassen, von denen aber nur zwei genauer charakterisiert wurden: Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Chemokine. Diese enthalten jeweils vier Cystein-Aminosäuren, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Die  $\alpha$ -Chemokine zeichnen sich dadurch aus, dass die ersten beiden Cysteine durch eine andere Aminosäure

voneinander getrennt werden (CXC = Cystein - eine andere beliebige Aminosäure X - Cystein). Man muss außerdem unterscheiden, ob das  $\alpha$ -Chemokin die Sequenz Glutaminsäure-Leucin-Arginin am N-terminalen Ende trägt oder nicht. Im ersten Fall besteht eine Affinität zu Neutrophilen, ansonsten zu Lymphozyten (Luster A. D. 1998).

Bei den  $\beta$ -Chemokinen liegen die ersten beiden Cysteine nebeneinander (CC = Cystein-Cystein). Auch hier teilt man die Chemokine weiter in zwei Familien ein.

Die erste besteht einerseits aus Eotaxin und Proteinen, die Monozyten „anlocken“, der zweiten werden alle restlichen Chemokine zugeschrieben. Generell beziehen sich die  $\beta$ -Chemokine auf Monozyten, Eosinophile, Basophile, und Lymphozyten. Auch bei ihnen spielt die Sequenz am N-terminalen Ende bezüglich der Aktivität und Affinität eine wichtige Rolle (Luster A. D. 1998).

Zwei Chemokine machen in der allgemeinen Klassifikation eine Ausnahme: Lymphotaktin, das nur zwei Cysteine hat und Fractalkin, bei dem die ersten beiden Cysteine durch drei Aminosäuren getrennt sind (= CX3C).

In einer neuen Gliederung wurden Chemokine bei Mäusen mit denen im menschlichen Körper verglichen. Die Chemokine wurden hier in vier Gruppen eingeteilt, je nach ihrem gemeinsamen Auftreten in den beiden Organismen (Zlotnik A. et al. 2000).

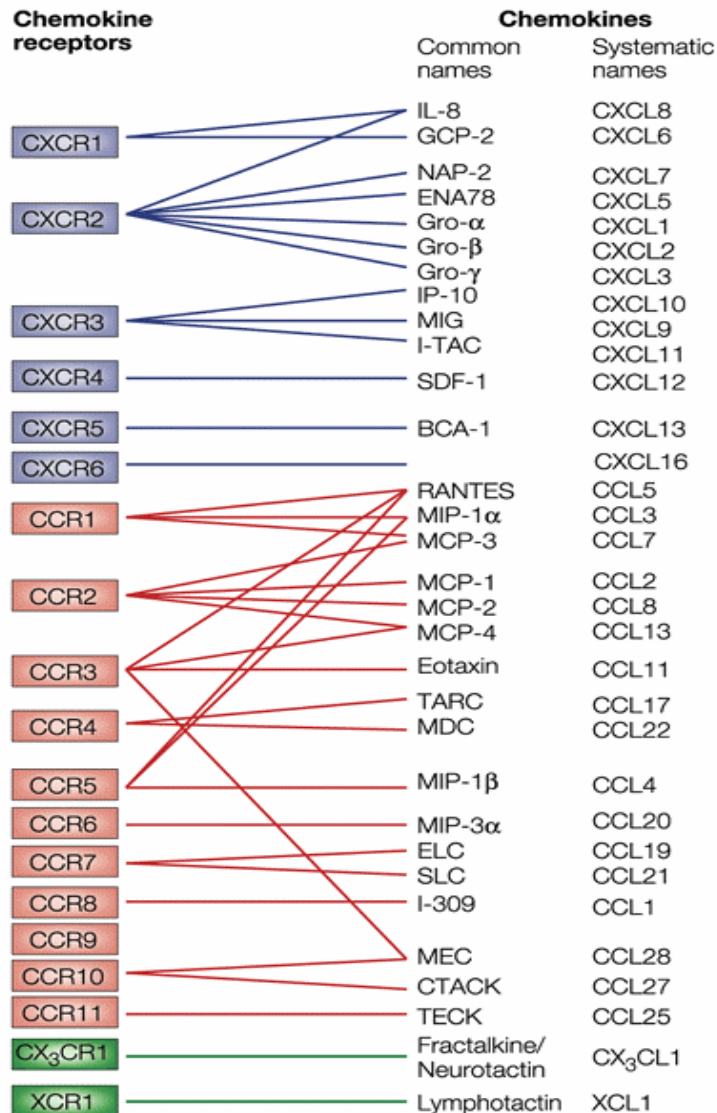
Einteilung	Definition
<b>Gruppe 1</b>	• Chemokine, die eindeutig einem menschlichen Liganden entsprechen
<b>Gruppe 2</b>	• Chemokine, bei denen ein menschliches Pendant vermutet wird, aber noch nicht bewiesen ist
<b>Gruppe 3</b>	• Chemokine, für die kein entsprechender Ligand im Menschen gefunden wurde
<b>Gruppe 4</b>	• Menschliches Chemokin, für das kein Pendant in der Maus existiert

**Tab. 7:** Neue Gliederung von Chemokinen, je nach Auftreten bei Mensch und Maus.

### 1.6.2 Chemokinrezeptoren

Die biologischen Effekte der Chemokine werden über Bindung an Rezeptoren vermittelt, welche aus sieben Domänen bestehen und die transmembran angeordnet sind (Baggiolini M. et al. 1997). Man kennt heute sechs CXC-, zehn CC- sowie einen CX3C- und einen XC-Rezeptor. Ein Rezeptor kann von unterschiedlichen Chemokinen besetzt werden, allerdings nur bezogen auf die Klasse, der er zugehörig ist. Die Information wird durch G-Proteine weitergeleitet. Diese bestehen aus drei Untereinheiten ( $G\alpha$ ,  $G\beta$ ,  $G\gamma$ ). Bei Rezeptor-Kontakt wird eine Dissoziation der  $\alpha$ - von der  $\beta$ -,  $\gamma$ -Einheit ausgelöst.  $G\alpha$  und  $G\beta$ ,  $\gamma$  aktivieren jeweils verschiedene Zielmediatoren: Inositoltriphosphat, Calcium, Phospholipase C, Ras- und Rho-Proteine. Letztendlich resultiert aus der Zellstimulation eine Erhöhung

der Zell-Motilität (Luster A. D. 1998), eine Aktivierung von bestimmten Zielgenen oder aber auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Enzymen, die eventuelle Erreger, aber auch das Gewebe schädigen können (MacDermott R. P. et al. 1998). Die Ausprägung der Rezeptoren auf den verschiedenen Unterarten der Leukozyten ist unterschiedlich und hängt sehr vom Aktivierungs- und Differenzierungsgrad ab.



**Abb.3:** Die Chemokinrezeptoren und ihre Liganden (aus Proudfoot A. E. I., *Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. Nat Rev Immunol* 2002;2:106-15).

### 1.6.3 Funktionen von Chemokinen

Schon die Vielfalt der Chemokine macht ersichtlich, dass sich ihre Effekte auf mehrere Bereiche auswirken. Eine Schlüsselrolle nehmen sie aber vor allem bei der Koordination der Leukozyten ein. So fördern Entzündungsreaktionen durch verstärkte Chemokinfreisetzung die Einwanderung von Leukozyten. Die Mediatoren werden von den verschiedensten Zellen in fast allen Organen gebildet, meist aufgrund proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , viraler und bakterieller Bestandteile (Luster A. D. 1998).

Das Zusammenspiel von Chemokinen mit den restlichen Zytokinen bestimmt letztendlich den Infiltrattyp: Bakterielle Infektionen führen über IL-8/CXCL8 vor allem zur Einwanderung von Neutrophilen (Chollet-Martin S. et al. 1993), während Viren über IP-10/CXCL10 und MCP-1/CCL2 zur Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten führen (Lahrtz F. et al. 1997).

Selbst die Entwicklung eines kompetenten Immunsystems ist auf das Vorhandensein dieser Mediatoren angewiesen. Die Lymphopoese im Knochenmark und im Thymus ist von einer Vielzahl von Chemokinen abhängig. Versuche an Mäusen zeigten, dass diese schwere, teils tödliche Immundefekte ausbildeten, falls die Regulationsmechanismen der Chemokine gestört wurden (Zlotnik A. et al. 2000). Während einer Wundheilung, aber auch in Folge von chronischen Krankheiten, wie Psoriasis oder rheumatischer Arthritis erfolgt eine Neubildung von Gefäßen. Dieser Prozess wird, je nach Chemokin-Subtyp, unterstützt oder in seiner Entwicklung gehemmt. Auch beim Wachstum eines Tumors spielt dieser Effekt eine große Rolle. Allerdings scheint das Verhältnis hier sehr unausgeglich zu sein, was die Ausbreitung des Tumors unterstützen könnte. Doch der Einfluss der Chemokine auf Tumore hat womöglich noch größere Ausmaße. So wird vermutet, dass die Invasivität und die Art der Metastasierung von der Ausprägung und Verteilung bestimmter Rezeptoren abhängt (Rossi D. et al. 2000).

### 1.6.4 Chemokine bei CED

Im Verlauf eines Entzündungsprozesses wird eine Vielzahl von Mediatoren freigesetzt. Deshalb wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Chemokine eingehend bezüglich ihrer Rolle bei CED näher untersucht.

IL-8/CXCL8, welches seine Wirkung über die Rezeptoren CXCR1 und CXCR2 entfaltet, wird bei beiden Gruppen der CED vermehrt exprimiert und korreliert mit der Schwere der Erkrankung. Durch den starken Einfluss auf bestimmte Leukozyten vermutet man einen Zusammenhang mit der Entstehung einer Kryptitis sowie auch von Kryptenabszessen. MIP-1 $\alpha$ /CCL3, MIP-1 $\beta$ /CCL4 und RANTES/CCL5, die eine Bindung mit dem Rezeptor CCR5 eingehen, spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses bei CED (Mac Dermott R. P. et al. 1998, Papadakis K. A. 2004). MCP-1/CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1*) wird auch im nicht von CED betroffenen Darm kontinuierlich produziert und bewirkt über CCR2 eine Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen sowie eine Freisetzung von IL-10 (Papadakis K. A. et al. 2000). ENA-78/CXCL5 aktiviert über CXCR2 Neutrophile und wurde in der Mukosa von Crohn-Patienten gefunden. Allerdings zeigte sich hier ein inverses Verhältnis, mit höherer Expression bei geringerer Krankheitsaktivität (MacDermott R. P. et al. 1999). IP-10/CXCL10 wird zwar auch in normaler Schleimhaut gefunden, wird aber während einer Entzündung vermehrt produziert. Über eine Bindung an CXCR3 wird eine Chemotaxis auf Lymphozyten erzielt. Zellen, die diesen Rezeptor tragen, werden erstaunlicherweise nicht so sehr in der Mukosa, sondern in den Lymphknoten gefunden, in die das entzündete Gebiet drainiert wird. Die erhöhte Expression wird vermutlich durch IL-2 bewirkt. CXCR3 führt über IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zur Stimulation von TH1-Zellen sowie erneuter IP-10 Sekretion. Somit wird der Entzündungsprozess aufrechterhalten (Papadakis K. A. et al. 2000).

Das Chemokin Fractalkin/CX3CL1 wird von Epithel- und Endothelzellen im Dünndarm gebildet. Sein Rezeptor CX3CR1 wird vor allem auf natürlichen Killerzellen, CD8+ Lymphozyten des Darmepithels, CD16+ Monozyten und dendritischen Zellen des terminalen Ileums gefunden. Bei M. Crohn-Patienten wird es in erhöhtem Maß in der Darmschleimhaut exprimiert (Ancuta P. et al. 2003, Dwinell M. B. et al. 1999).



### 1.6.5 CX3CL1/ Fractalkin

Fractalkin besteht aus mehreren Untereinheiten. Intrazellulär befindet sich ein 37 Aminosäuren langer Rest, der über eine kurze Transmembranregion mit dem Mucin-ähnlichen, extrazellulärem Anteil verbunden ist. Am N-terminalen Ende ist hier die Chemokin-Domäne lokalisiert, die sich durch ihre Struktur von der üblichen Chemokin-Klassifizierung abgrenzt, da die ersten beiden Cysteine durch drei andere Aminosäuren voneinander getrennt sind (= CX3CL1). Da Fractalkin im Vergleich zu den restlichen Chemokinen andersartig aufgebaut ist, kann es sowohl chemotaktische Eigenschaften vorweisen, als auch als Adhäsionsmolekül fungieren (Muehlhoefer A. et al. 2000).

Die Signale werden über den Rezeptor CX3CR1 (ehemals V28) vermittelt, der vor allem auf NK-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, CD8+ und CD4+ T-Zellen sowie auch auf Mikrogliazellen, Astrozyten und Neuronen des Hippocampus nachgewiesen wurde. Neue Studien zeigten, dass im Gastrointestinaltrakt CX3CR1 auch von Epithelzellen exprimiert wird (Brand S. et al. 2002). Die Bindung an diesen Rezeptor resultiert in einer Aktivierung der Mediatoren ERK-1/2, p53, IL-8 und NF- $\kappa$ B (Brand S. et al. 2002). NF- $\kappa$ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der vor allem innerhalb der Immun- und Entzündungsantwort eine bedeutende Position einnimmt. Er induziert die Entstehung von Adhäsionsmolekülen sowie die Expression proinflammatorischer und chemotaktischer Zytokine (Brand S. et al. 2002). Das Zusammenspiel von ERK-1/2 und NF- $\kappa$ B ist somit eine wichtige Komponente in der Immunantwort der Mukosa sowie der Wundheilung. Ein weiterer Effekt, der durch Fractalkin bewirkt wird, ist die Aktivierung von p53. Dieser Mediator nimmt Einfluss auf die Zellapoptose, das Zellwachstum und die Entstehung von Karzinomen.

Im Gastrointestinaltrakt führt Fractalkin zur Rekrutierung neutrophiler Granulozyten sowie intraepithelialer Leukozyten und mononukleärer Zellen der Lamina propria. Bei Patienten mit M. Crohn fand sich eine erhöhte Expression von Fractalkin-mRNA in der Mukosa, was wiederum die Migration von Leukozyten und Lymphozyten fördert (Muehlhoefer A. et al. 2000). Die Adhäsion von Monozyten, CD8+ T-Zellen und CD16/56+ NK-Zellen an das Endothel sowie die Einwanderung von Lymphozyten in entzündetes Gewebe wird als eine weitere

Reaktion auf Fractalkin diskutiert (Chapman G. A. et al. 2000, Fong A. M. et al. 1998).

Gewisse Genotypen des Fractalkin-Rezeptors, die sich als *Single-Nukleotid-Polymorphismen* (SNP) auf Codon 249 und 280 darstellen, scheinen bezüglich ihrer Funktion Unterschiede aufzuweisen. In einer Studie über den Einfluss auf die Entstehung einer Atherosklerose hatten Individuen mit dem I249 Allel, im Gegensatz zur V249 Gruppe, ein geringeres Risiko, eine strukturelle oder funktionelle Veränderung des Endothels zu entwickeln (Cybulsky M. I. et al. 2003, McDermott D. H. et al. 2001). Bei HIV-Patienten erfolgte bei homozygotem Status für I249, kombiniert mit M280, eine schnellere Progression der Erkrankung (Faure S. et al. 2000). Aufbauend auf diese Ergebnisse wurde ein Einfluss von CX3CR1-Polymorphismen auch auf andere Immunerkrankungen wie den M. Crohn hypothesiert.

## **1.7 Zielsetzung**

Fractalkin induziert proinflammatorische und chemotaktische Signale und aktiviert Signaltransduktionswege in den CX3CR1-exprimierenden, v. a. dendritischen Zellen (Fong A. M. et al. 1998, Niess J. H. et al. 2005). Da die Rekrutierung von Leukozyten ein wesentlicher Faktor bei der Krankheitsentstehung des M. Crohn ist, vermutet man, dass der Mediator Fractalkin einen Einfluss auf CED haben könnte. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf dem Fractalkin-Rezeptor CX3CR1. Es sollte untersucht werden, in wie weit sich der T280M- und V249I-Polymorphismus auf die Ausbildung und den Phänotyp des M. Crohn auswirken. Im experimentellen Teil wurde hierfür mittels PCR die DNA von M. Crohn-Patienten repliziert, um anschließend durch Restriktionsenzyme Genvarianten mittels Restriktionslängenpolymorphismen (RFLP) charakterisieren zu können. Damit man eine Aussage über eventuelle signifikante Unterschiede beim Genotyp im Vergleich zu gesunden Personen treffen konnte, wurde derselbe Versuchsansatz mit einer entsprechenden Anzahl eines Kontrollkollektivs durchgeführt.

Die retrospektive Analyse der Patientenakten sowie der Einsatz von Fragebögen ermöglichten es, Aussagen über einen eventuellen Einfluss der festgestellten Polymorphismen auf den Krankheitsverlauf bzw. Phänotyp der Patienten machen zu können. Hierbei wurde die Vienna-Klassifikation genutzt (Gasche C. et al. 2000), die das Befallsmuster, die Ausprägung (Stenose, Abszesse, Fisteln, etc.) und das Alter bei Erstdiagnose berücksichtigt. Aber auch das Ausmaß der notwendigen Therapie (medikamentös, operativ) wurde beobachtet. Durch Korrelation der verschiedenen Phänotypen mit den untersuchten Polymorphismen sollte festgestellt werden, ob ein bestimmter Genotyp mit einem spezifischen Krankheitsphänotyp einhergeht, d. h. ein Einfluss gewisser Genvarianten des Fractalkin-Rezeptors CX3CR1 bei der Entstehung und Ausprägung des M. Crohn besteht.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Patienten und Probanden**

In dieser Studie wurden insgesamt 206 Patienten mit der Diagnose M. Crohn (= MC) untersucht. Das Vergleichskollektiv bestand aus 211 gesunden Personen, die mit den Patienten und untereinander nicht verwandt waren. Die Diagnosestellung des M. Crohn wurde durch Anamnese, Endoskopie, Radiologie sowie durch histopathologische Befunde verifiziert.

Die demographischen und klinischen Daten, wie der Gebrauch von Immunsuppressiva, bisherige Operationen, Komplikationen, die Lokalisation und Schwere der Erkrankung wurden unter anderem durch retrospektive Analyse der Patientenakten und mittels Fragebögen bei der Patientenaufnahme dokumentiert. Eine Einteilung der M. Crohn-Patienten nach Alter bei der Erstdiagnose, Krankheitslokalisation und dem Krankheitsverhalten erfolgte nach den Kriterien der Vienna-Klassifikation (Gasche C. et al. 2000).

Das Kontrollkollektiv bestand aus gesunden Patienten deutscher Herkunft. Die Verteilung des Geschlechts und Alters wurde den M. Crohn-Patienten angepasst. Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München genehmigt. Alle teilnehmenden Personen wurden über die genetische Untersuchung aufgeklärt und gaben dazu ihr schriftliches Einverständnis.

<b>Merkmale</b>	<b>MC (n=206)</b>	<b>Kontrollen (n=211 )</b>
<b>Geschlecht</b>		
Männlich (%)	97 (47,1%)	100 (47,4%)
Weiblich (%)	109 (52,9%)	111 (52,6%)
<b>Alter (J)</b>		
Mittelwert $\pm$ SD	38,5 $\pm$ 11,8	46,4 $\pm$ 15,2
Bereich	16 - 73	21 – 84
<b>Alter bei Diagnose (J)</b>		
Mittelwert $\pm$ SD	27,7 $\pm$ 11,6	
Bereich	7 - 71	
Median	24	
<b>Krankheitsdauer (J)</b>		
Mittelwert $\pm$ SD	10,8 $\pm$ 8,2	
Bereich	1 - 42	
Median	9	
<b>CED in der Familie (%)</b>		
Positiv	27 (13,1%)	
Negativ	179 (86,9%)	

**Tab. 8:** Die Verteilung demographischer Daten innerhalb des Patienten- und Vergleichskollektivs.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Geräte**

Tischzentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Heizblock	Lab-Line Inc., Illinois, USA
Thermocycler MJ Research PTC 225	Biozym, Hess, Oldendorf
Freezer -80° C Hera Freeze	Heraeus, Hanau
Wärmeschrank 37° C B 5028	Heraeus, Hanau
Waage	Mettler, Gießen
Elektrophoresekammern	Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsgeräte	Amersham Biosciences, Freiburg
Video-Photoanlage	MWG-Biotech, Ebersberg
Gelträger	Invitrogen, Karlsruhe
Pipetten „Pipetman“	Gilson, Bad Camberg

### **2.2.2 Verbrauchsmaterialien**

Pipettenspitzen	Kisker, Steinfurt
PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, Hamburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg

### 2.2.3 Chemikalien

#### 2.2.3.1 Präparation genomischer DNA

QIAamp®DNA Blood Mini Kit                      Qiagen, Hilden

⇒    QIAamp Spin Column  
       QIAGEN-Protease  
       Eluationspuffer AE  
       Lysispuffer AL  
       Waschpuffer AW1/AW2

#### 2.2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Thermo-Start DNA-Polymerase	ABgene, Hamburg
Optimized 10x Start-Puffer	ABgene, Hamburg
MgCl <sub>2</sub>	ABgene, Hamburg
dNTP	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot
Primer	Thermo Electron Corporation, Ulm
Aqua bidest.	Baker, Deventer, Niederlande

#### 2.2.3.3 Präzipitation von DNA

Natriumchlorid (4 M)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100%)	Merck, Darmstadt
Aqua bidest.	Baker, Deventer, Niederlande

### 2.2.3.4 Restriktionsverdau

Enzym Acl I (3000 U/ml)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Enzym HpyCH4 III (5000 U/ml)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
BSA (1 mg/ml)	New England BioLabs, Frankfurt/Main
NEBuffer 4	New England BioLabs, Frankfurt/Main

- ⇒ 50 mM Potassium-Acetat
- 20 mM Tris-Acetat
- 10 mM Mg-Acetat
- 1 mM Dithiothreitol
- pH 7,9 bei 25° C

Aqua bidest.	Baker, Deventer, Niederlande
--------------	------------------------------

### 2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
10x (Marathon) TBE-Puffer	
⇒ 1,35 M Tris	Invitrogen, Karlsruhe
0,45 M Borsäure	Roth, Karlsruhe
25 mM EDTA	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
Ficoll-Auftragepuffer	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
⇒ 15% Ficoll	
0,25% Bromphenolblau	
0,25% Xylencyanol	
Ethidiumbromid	Sigma/Aldrich, Taufkirchen
DNA Molecular Weight Marker	Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot



## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Präparation genomischer DNA**

Genomische DNA lässt sich aus Na<sub>2</sub>-EDTA versetztem Vollblut der Patienten gewinnen.

Die Arbeitsschritte erfolgten entsprechend der Anleitung des QIAamp Blood Mini Kits. In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß werden zunächst 20 µl der QIAGEN-Protease und 200 µl der Patientenprobe gegeben. Nach einer Zugabe von 200 µl Lysispuffer und Durchmischung der Lösung erfolgt eine Inkubation bei 56° C für 10 min. Um Flüssigkeitsansammlungen am Deckel zu entfernen, wird das Gefäß kurz zentrifugiert. Anschließend fügt man 200 µl Ethanol zur Probe hinzu und mischt den Ansatz wiederum. Der gesamte Inhalt des Reaktionsgefäßes wird nun vorsichtig auf die QIAamp-Chromatographiesäule pipettiert und danach 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Nach der Zugabe von 500 µl des Waschpuffers AW1 erfolgt eine einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm. Die Säule wird in ein neues 2 ml-Gefäß gesetzt, mit 500 µl des Waschpuffers AW2 versetzt und bei 14000 rpm 3 min zentrifugiert. Anschließend gibt man die Säule in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß und fügt 200 µl Elutionspuffer hinzu. Als letzter Schritt erfolgt eine Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min.

### **2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der eine spezifische Sequenz eines DNA-Doppelstranges mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert werden kann. Durch Erhöhen der Temperatur auf 90° C erfolgt die Trennung der beiden DNA-Doppelstränge. Nach Abkühlen lagern sich Oligonukleotide (Primer) an das zu replizierende Segment. Primer bestehen aus 15-25 Basen und sind zur Sequenz der 5'-Enden der beiden Einzelstränge komplementär. Sie bestimmen die Größe der zu amplifizierenden DNA.

CX3CR1-PCR	Primer	Basenlänge	Größe des PCR-Produkts (bp)
Vorwärts	5'-AGAATCATCCAGACGCTGTTTTCC-3'	24	311 bp
Rückwärts	5'-CACAGGACAGCCAGGCATTCC-3'	22	

**Tab. 9:** Sequenz der Primer einer CX3CR1-PCR.

Durch den Einsatz der Taq-Polymerase werden die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen ergänzt. Die Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte führt somit zur exponentiellen Vervielfältigung des gewünschten Abschnitts. Die Thermostabilität der Taq-Polymerase verhindert deren Denaturierung während der einzelnen Zyklen.

### 2.3.2.1 PCR-Protokoll

Zu Beginn einer PCR erstellt man gemäß eines PCR-Protokolls einen „Mastermix“, entsprechend der Anzahl „n“ der zu untersuchenden Proben. Dieser wird in die PCR-Reagenzgefäße vorgelegt. Anschließend werden dazu 5 µl der gewünschten DNA (100-300 ng) pipettiert. Das Protokoll für die PCR von CX3CR1 lautet wie folgt:

- 5 µl genomische DNA
- 5 µl 10x Puffer
- 5 µl dNTP (1,25 mM)
- 3 µl MgCl (25 mM)
- 1 µl vorwärts Primer (20 µM)
- 1 µl rückwärts Primer (20 µM)
- 0,25 µl DNA-Polymerase (5 U/µl)
- 30 µl Aqua bidest.
- ⇒ 50 µl Gesamtvolumen

Nach Zugabe der Reagenzien zur DNA und sorgfältigem Mischen aller Komponenten, erfolgt die Replikation der Zielsequenz im Thermocycler. Dies wird durch eine genaue Anpassung der Reaktionsschritte an die zu amplifizierende Region erreicht.

### 2.3.2.2 PCR-Bedingungen für CX3CR1

PCR-Schritte	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung der genom. DNA	94° C	12 min	1 x
Denaturierung	94° C	20 sec	40 x
Hybridisierung/Anlagerung	69° C	20 sec	40 x
Synthese	72° C	20 sec	40 x
Abschließender Syntheseschritt	72° C	5 min	1 x

**Tab. 10:** PCR-Bedingungen für CX3CR1.

Die Bedingungen für die PCR-Schritte wurden aus einer Arbeit von McDermott et al. (Circ Res 2001; 89:401-407) übernommen.

### 2.3.3 Positiv- und Negativkontrolle

Um eine eventuelle Kontamination der PCR-Produkte mit Fremd-DNA überprüfen zu können, wurde bei allen PCR-Reaktionen eine Negativkontrolle eingeschlossen. Diese besteht aus allen Reagenzien eines PCR-Ansatzes, jedoch erfolgt keine DNA-Zugabe. Sieht man dennoch ein Produkt in der Elektrophorese, muss man davon ausgehen, dass der PCR-Ansatz mit DNA kontaminiert und somit die Ergebnisse verfälscht sein können.

Mit Hilfe einer Positiv-Kontrolle überprüft man die Effektivität eines Restriktionsenzym. Durch das Mitführen einer bereits bearbeiteten Probe muss beim Verdau ein bekanntes Muster erscheinen.

### 2.3.4 Präzipitation von DNA

Durch Zugabe von Ethanol und Salzen können die in der PCR entstandenen DNA-Produkte gefällt werden. Der Mechanismus, der diesem Vorgang zu Grunde liegt, basiert auf der Anlagerung der positiv geladenen Anteile der Salzionen an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Durch die Zugabe von 100% Ethanol erfolgt Wasserentzug, der in der Präzipitation der DNA resultiert.

Als Initialschritt werden 50 µl des PCR-Produkts mit je 2,5 µl einer 4 M NaCl-Lösung versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 125 µl eisgekühltem (-20° C) 100% Ethanol. Nach Mischen werden die Ansätze 20-30 min bei -80° C gelagert. Durch die Zentrifugation bei 4° C und 14000 rpm für 30 min pelletiert die DNA und der Überstand kann abgekippt werden. Das Präzipitat muss nun noch luftgetrocknet werden.

### 2.3.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme werden nur von Bakterien gebildet. Sie spalten die doppelsträngige DNA an für sie spezifischen Erkennungssequenzen. Diese Abschnitte bestehen aus wenigstens vier Basenpaaren und weisen eine sogenannte palindromische Struktur auf, d. h. die Basensequenz in den beiden Einzelsträngen muss – von 5´-Ende gelesen - identisch sein. Mutationen in diesem Gebiet können durch eine daraus resultierende Basenveränderung erkannt werden, da durch die Spezifität des Enzyms keine Spaltung mehr erfolgen kann.

#### 2.3.5.1 Restriktionsenzym Acl I

Zur Typisierung des CX3CR1-Polymorphismus am Codon 249 von CX3CR1 werden pro Probe 2 µl Acl I eingesetzt. Versetzt mit 1 µl BSA und 1 µl NEBuffer 4 wird das Reaktionsprodukt bei 37° C über Nacht inkubiert. Es schneidet an der Erkennungsstelle 5´...AA↓CGTT...3´/3´...TTGC↑AA...5´.

### 2.3.5.2 Restriktionsenzym HpyCH4 III

Für die Bestimmung des CX3CR1-Polymorphismus am Codon 280 wird das PCR Produkt mit 1,5 µl HpyCH4 III und 1 µl NEBuffer 4 versetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37° C über Nacht. Die Erkennungssequenz dieses Enzyms ist 5'...ACN↓GT... 3' / 3'...TG↑NCA...5'.

Beide Probenansätze werden jeweils mit H<sub>2</sub>O auf eine Gesamtmenge von 10 µl aufgefüllt. Durch den Einsatz dieser beiden Restriktionsenzyme lassen sich Aussagen über Polymorphismen des Chemokin-Rezeptors CX3CR1 machen. Konkret führt ein Einsatz von Acl I am Codon 249 zu einer Spaltung in 107 bp- und 204 bp-großen Bruchstücken, solange an der Nukleotidposition 745 ein Guanin vorhanden ist. Eine Spaltung bleibt aus, falls anstelle eines Guanin ein Adenin eingebaut ist.

Am Codon 280 spaltet das Enzym HpyCH4 III das PCR-Produkt ebenfalls in 107 bp- und 204 bp-große Anteile, solange an der Nukleotidposition 839 ein Cytosin präsent ist. Beim Auftreten eines Thymin geht die Schnittstelle verloren. Die unterschiedlichen Ausprägungen der Basen an Codon 249 und 280 führen zu folgenden Polymorphismen:

Polymorphismus	Basenveränderung	Resultierende Aminosäure
<b>I249V</b>	Guanin ⇒ Adenin (Pos. 745)	Valin ⇒ Isoleucin
<b>M280T</b>	Cytosin ⇒ Thymin (Pos. 839)	Threonin ⇒ Methionin

Tab. 11: Aminosäurenaustausch durch CX3CR1-Polymorphismen.

### **2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese der Restriktionsverdau-Produkte**

In der Gelelektrophorese werden die im Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies geschieht durch Anlegen einer Spannung an das Gel und der folgenden Wanderung der Fragmente. Die Auftrennung ist abhängig von der Spannung, der DNA-Größe sowie der Agarosekonzentration des Gels. Für die Produkte des Restriktionsverdaus verwendet man 2%ige Agarose. Zur Überprüfung der PCR-Produkte reicht eine 1,5%ige Agarose aus. Die entsprechende Menge Agarose wird mit 1xTBE Puffer im Mikrowellenherd gekocht und in einen Gelträger gegossen. Nach Abkühlen des Gels wird dieses in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit ausreichend 1xTBE Puffer bedeckt. Zu den Proben werden 2 µl Ficoll-Ladepuffer pipettiert und diese anschließend kurz zentrifugiert. Die beschwerte DNA wird in die Taschen des Agarosegels gegeben. Nach Anlegen der Spannung (je nach Gelgröße resultierende Stromstärke zwischen 50-100 mA) erfolgt die Wanderung der Fragmente. Zum Größenvergleich wird pro Gel ein DNA-Größenmarker (*1kb DNA ladder*) in eine Geltasche pipettiert. Zur Markierung der DNA wird das Gel in eine Ethidiumbromid-Lösung (EtBr) (0,5 µg/ml) gelegt und das überschüssige EtBr durch ein erneutes Anlegen der Spannung an das Gel (für 5-10 min) entfernt. Ethidiumbromid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, der die DNA durch Beleuchtung des Gels mit langwelligem UV-Licht (302 nm) erkennbar macht. Die unterschiedlich weit gewanderten DNA-Produkte werden so sichtbar und können durch Fotografie dokumentiert werden (Abb. 5).

### **2.4 Statistische Auswertung**

Für den Vergleich qualitativer Merkmale wurde der Fisher's exakt oder der  $\chi^2$ -Test angewandt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde eingesetzt, um quantitative Daten zu vergleichen. Alle Tests erfolgten zweiseitig. Als signifikant galt ein P-Wert von kleiner als 0,05. Für die statistische Analyse wurden SPSS 12.0 und SAS 8.2 für Windows verwendet.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Resultate des Restriktionsverdaus

Durch den Restriktionsverdaus erhielt man die verschiedenen Ausprägungen der Genotypen. Beim Austausch von Guanin durch Adenin an der Nukleotidposition 745 erfolgte ein Ersatz von Valin auf Codon 249 durch Isoleucin (I249). Eine Substitution von Cytosin durch Thymin an der Nukleotidstelle 839 resultierte in einem Wechsel von Threonin in Methionin (M280) auf Codon 280 (Faure S. et al. 2000, McDermott D. H. et al. 2001).

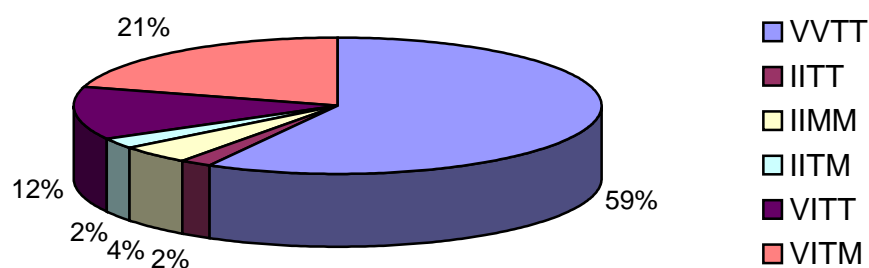
Es wurden sowohl für V249I als auch für T280M ein Wildtyp und Polymorphismen in heterozygoter oder homozygoter Ausprägung gefunden. Bei den Untersuchungen stellte sich heraus, dass bei der Verteilung der CX3CR1-Polymorphismen nach der bisherigen Studienlage ein sogenanntes „*linkage disequilibrium*“ auftrat, d. h. dass gewisse Kombinationen von Allelen oder genetischen Markern häufiger erscheinen, als von einer Zufallsverteilung statistisch zu erwarten wäre und somit ein gewisser Grad von Abhängigkeit besteht. Bei CX3CR1 zeigt sich dies beim Auftreten des SNP „VV“ (Wildtyp) auf Codon 249. Hier kann auf Codon 280 nur der SNP „TT“ (Wildtyp) resultieren. „VI“ auf Codon 249 ist nie mit „MM“ auf Codon 280 assoziiert. Weiterhin sind homozygote Träger des T280M-Genotyps („MM“) immer ebenso homozygote Träger des V249I-Genotyps („II“). Somit stellten sich insgesamt sechs von neun theoretisch möglichen Kombinationen (siehe Abb. 4) für die beiden Codons von CX3CR1 dar (Faure S. et al. 2000, McDermott D.H. et al. 2001):

Codon 249	Codon 280
VV	TT
VI	TT
VI	TM
II	TT
II	TM
II	MM

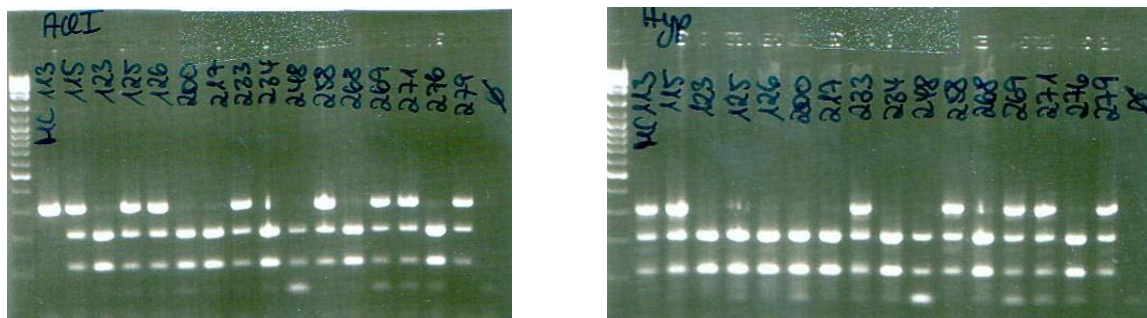
**Tab. 12:** Die verschiedenen SNPs und der Wildtyp (VV/TT) von CX3CR1.

V = Valin, M = Methionin, I = Isoleucin, T = Threonin

### Kombinierte Genotypen bei M. Crohn (%)



**Abb. 4:** Kombination der Polymorphismen am Codon 249 und 280 bei M. Crohn-Patienten.

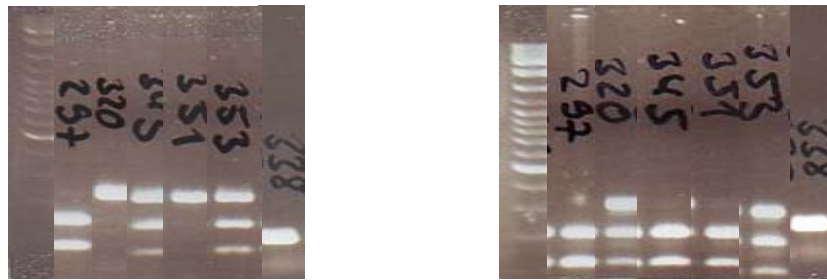


**Abb. 5:** Beispiel einer Gelelektrophorese der Restriktionsverdauprodukte.

Durch das Enzym Acl I (links) und HpyCH4 III (rechts) entstehen:

- Geschnittenes Produkt, d.h. zwei Banden (107 und 204 bp) = Wildtyp, entspricht Aminosäuren VV bei Acl I bzw. TT bei HpyCH4 III (z. B. Nr. 123).
- Eine Bande (311 bp) bei homozygotem Polymorphismus, entspricht Aminosäuren II bei Acl I bzw. MM bei HpyCH4 III (z. B. Nr. 113 bei Acl I).
- Drei Banden (311, 107 und 204 bp) bei heterozygotem Polymorphismus, entspricht Aminosäuren VI bei Acl I bzw. TM bei HpyCH4 III (z. B. Nr. 115).





**Abb. 6:** Die kombinierten Genotypen beim Verdau mit Acl I und HpyCH4 III.

Wildtyp: VV/TT= zwei Banden bei Acl I und HpyCH4 III: z. B. Nr. 297

Polymorphismen: II/TM= eine Bande bei Acl I und drei bei HpyCH4 III: z. B. Nr. 320

II/MM= eine Bande bei Acl I und eine bei Hpy CH4 III: z. B. Nr.338

VI/TT= drei Banden bei Acl I und zwei bei HpyCH4 III: z. B. Nr. 345

II/TT= eine Bande bei Acl I und zwei bei Hpy CH4 III: z. B. Nr. 351

VI/TM= jeweils drei Banden bei Acl I und HpyCH4 III: z. B. Nr. 353

### 3.2 Vergleich mit dem Kontrollkollektiv

Durch den Vergleich der Crohn-Patienten mit einem gesunden Kontrollkollektiv sollte festgestellt werden, ob eine Abweichung in der Häufigkeitsverteilung der unterschiedlichen Polymorphismen besteht. Die demographischen Daten der Patienten und der gesunden Personen zeigt Tabelle 8. Die M. Crohn-Patienten wurden bei der Erstdiagnose je nach Krankheitslokalisation, Krankheitsausprägung und Alter unterteilt. Diese Einteilung erfolgte nach den Kriterien der Vienna-Klassifikation (Gasche C. et al. 2000). Diese ist 1998 auf dem World Congress of Gastroenterology in Wien erstellt worden. Sie umfasst das Ersterkrankungsalter, die Lokalisation und den Verlauf des M. Crohn (siehe Tab. 13):

Hauptgruppen der Klassifikation	Untergliederung	Definition
<b>Alter bei Erstdiagnose (=A)</b>	A1	unter 40 Jahren
	A2	über 40 Jahren
<b>Lokalisation = maximales Ausmaß vor der ersten Resektion (=L)</b>	L1	terminales Ileum
	L2	Kolon
	L3	Ileokolon
	L4	oberer Gastrointestinaltrakt
<b>Ausprägung (Behaviour = B)</b>	B1	nicht stenosierend, nicht penetrierend
	B2	stenosierend
	B3	penetrierend (Fisteln, Abszesse, Konglomerattumor)

**Tab. 13:** Vienna-Klassifikation des M. Crohn (Gasche C et al. 2000).

Wie man in Tabelle 14 erkennen kann, bestand bei der Mehrheit der untersuchten Patienten eine schwere Ausprägung ihrer Krankheit. Ein penetrierender Krankheitsverlauf wurde bei 62.1% beobachtet. Gemäß der Vienna-Klassifikation (Gasche C. et al. 2000) umfasst dies sowohl Fisteln, Abszesse als auch Konglomerattumoren. 20,0% der Patienten zeigten einen stenosierenden Charakter. Außerdem manifestierte sich die Krankheit bei den meisten Personen bereits sehr früh (Mittelwert des Alters bei Erstdiagnose:  $27 \pm 11.6$  Jahre). Zusammengefasst bestand das Kollektiv der Individuen, die von M. Crohn betroffen waren, aus Patienten mit überwiegend schwerer Ausprägung ihrer Erkrankung.

	<b>A1: Alter bei Diagnose &lt; 40 J</b>			<b>A2: Alter bei Diagnose &gt; 40 J</b>			<b>Total</b> (n=206)
	(n=177)			(n=29)			
<b>Variable</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	
<b>L1</b>	4 (1,9%)	7 (3,4%)	20 (9,7%)	2 (1,0%)	2 (1,0%)	6 (2,9%)	41 (19,9%)
<b>L2</b>	6 (2,9%)	2 (1,0%)	19 (9,2%)	3 (1,5%)	0 (0%)	4 (1,9%)	34 (16,5%)
<b>L3</b>	15 (7,2%)	16 (7,8%)	57 (27,7%)	3 (1,5%)	3 (1,5%)	4 (1,9%)	98 (47,6%)
<b>L4</b>	4 (1,9%)	11 (5,3%)	16 (7,8%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (1,0%)	33 (16,0%)
<b>Total</b>	29 (14,0%)	36 (17,5%)	112 (54,4%)	8 (3,9%)	5 (2,4%)	16 (7,8%)	
<b>A1 +A2</b>				37 (17,9%)	41 (20,0%)	128 (62,1%)	206 (100%)

**Tab. 14:** Häufigkeiten der Phänotypen innerhalb des M. Crohn-Studienkollektivs gemäß der 24 Untergruppen der Vienna-Klassifikation (Gasche C. et al. 2000).

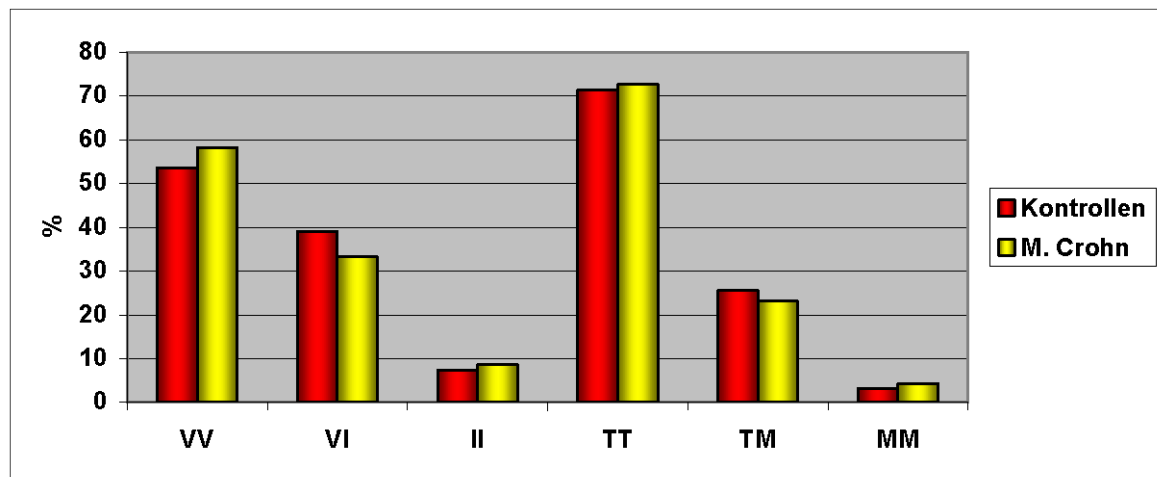
Das Kontrollkollektiv wurde bezüglich der Geschlechterverteilung und des Alters an die Crohn-Patienten angepasst. Allerdings wurde darauf geachtet, dass die Personen nicht zu jung waren. Dadurch sollte vermieden werden, dass möglicherweise durch eine spätere Krankheitsmanifestation die Ergebnisse der Vergleichsindividuen verfälscht werden könnten.

Die statistische Aufarbeitung der Daten ergab, dass kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der unterschiedlichen Polymorphismen zwischen gesunden und erkrankten Personen besteht. Bei den M. Crohn-Patienten waren 33,0%

heterozygot und 8,3% homozygot bezüglich des Polymorphismus V249I. Betreffend des Polymorphismus T280M waren 23,3% heterozygot und 4,4% homozygot.

Polymorphismus		MC (n=206)	Kontrollen (n=211)	P-Wert	OR (95% CI)
<b>Codon 249</b>	<b>VV</b> n=235	121 (58,7%)	114 (54,0%)	0,37	1,21 (0,82-1,78)
	<b>VI</b> n=150	68 (33,0%)	82 (38,9%)	0,22	0,78 (0,52-1,16)
	<b>II</b> n=32	17 (8,3%)	15 (7,1%)	0,72	1,18 (0,57-2,42)
<b>Codon 280</b>	<b>TT</b> n=300	149 (72,3%)	151 (71,6%)	0,91	1,04 (0,68-1,59)
	<b>TM</b> n=101	48 (23,3%)	53 (25,1%)	0,73	0,91 (0,58-1,42)
	<b>MM</b> n=16	9 (4,4%)	7 (3,3%)	0,62	1,33 (0,49-3,64)

**Tab. 15:** Vergleich der Verteilung der einzelnen CX3CR1-Polymorphismen zwischen M. Crohn-Patienten (MC) und dem Kontrollkollektiv.



**Abb. 7:** Gegenüberstellung der kombinierten Polymorphismen am Codon 249 und 280 bei M. Crohn-Patienten und Kontrollkollektiv.

### 3.3 Korrelation des Genotyps mit phänotypischen Merkmalen

Durch die retrospektive Analyse von Patientenakten und dem Einsatz von Fragebögen bei der Patientenaufnahme konnte ein Vergleich der Ergebnisse der genotypischen Analyse mit phänotypischen Merkmalen, wie Krankheitslokalisation, -ausprägung, Erkrankungsalter, Therapieschema, Komplikationen etc. getroffen werden. Dies erfolgte ebenfalls gemäß der Vienna-Klassifikation (Gasche C. et al. 2000). Die Polymorphismen V249I und T280M wurden getrennt voneinander betrachtet und entsprechend mit den Merkmalen korreliert.

Bei allen Patienten, die homozygot für den T280M-Polymorphismus waren, wurden Stenosen diagnostiziert ( $p = 0,03$  vs Wildtyp und heterozygote Merkmalsträger). Weiterhin bestand bei homozygoten T280M-Tägern eine signifikant erhöhte Beteiligung des Ileokolons im Vergleich zum Wildtyp oder heterozygoten T280M-Merkmalsträgern ( $p = 0,01$ ). Der T280M-Polymorphismus trat homozygot nur bei 4,4% aller Erkrankten auf.

Ähnliche Ergebnisse konnten bei homozygoten Trägern von V249I gefunden werden: Hier zeigte sich ebenfalls ein Trend für das Auftreten von Stenosen ( $p = 0,06$ ) sowie die Krankheitslokalisation im Ileokolon ( $p = 0,07$ ). Im Vergleich zu heterozygoten Merkmalsträgern fand sich für die Krankheitslokalisation im Ileum

ein signifikanter Unterschied (70,6% vs. 39,7%;  $p = 0,03$ ). Der T280M-Polymorphismus trat homozygot nur bei 4,4% aller Erkrankten auf.

Die Korrelation der restlichen phänotypischen Merkmale stellte keine weiteren Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen mehr dar. Der Gebrauch von Immunsuppressiva, die Häufigkeit von extraintestinalen Manifestationen oder Komplikationen, wie Fisteln und Abszesse, trat in allen Gruppen gleich häufig auf.

	(1) VV (n=121)	(2) VI (n=68)	(3) II (n=17)	(1) vs. (3) p - Wert	(1) vs. (3) p - Wert	(2) vs. (3) p - Wert	(1+2) vs. (3) p - Wert
<b>Männlich</b>	54 (44,6%)	32 (47,1%)	11 (64,7%)	0,76	0,19	0,28	0,13
<b>Body mass index</b> (kg/m <sup>2</sup> )	23,0±3,9	23,0±4,1	23,1±3,6	0,95	0,89	0,93	0,90
<b>Alter bei Diagnose (J)</b>							
Mittelwert ± SD	28,1±11,4	27,3 ±12,6	26,1±8,1	0,68	0,39	0,63	0,44
Bereich	7 – 64	13-71	12-40				
<b>Krankheitsdauer (J)</b>	10,9 ± 8,0	11,1± 8,6	13,7±8,8	0,81	0,22	0,30	0,23
<b>Alter</b>							
< 40 Jahre (A1)	102 (84,3%)	59 (86,8%)	16 (94,1%)	0,83	0,46	0,68	0,47
> 40 Jahre (A2)	19 (15,7%)	9 (13,2%)	1 (5,9%)				
<b>Lokalisation</b>							
Terminales Ileum (L1)	22 (18,2%)	18 (26,5%)	1 (5,9%)	0,19	0,30	0,10	0,20
Kolon (L2)	20 (16,5%)	12 (17,6%)	2 (11,8%)	0,84	1,00	0,72	0,74
Ileokolon (L3)	59 (48,8%)	27 (39,7%)	12 (70,6%)	0,28	0,12	0,03	0,07
Oberer GI (L4)	20 (16,5%)	11 (16,2%)	2 (11,7%)	1,00	1,00	1,00	1,00

<b>Ausprägung</b>							
Keine Striktur, nicht penetrierend (B1)	26 (21,5%)	11 (16,2%)	1 (5,9%)	0,44	0,19	0,44	0,20
Striktur (B2)	21 (17,4%)	13 (19,1%)	6 (35,3%)	0,84	0,10	0,19	0,10
penetrierend (B3)	74 (61,1%)	44 (64,7%)	10 (58,8%)	0,64	1,00	0,78	0,79
<b>Immunsuppressiva</b> <sup>1</sup>	90 (74,4%)	55 (80,9%)	14 (82,4%)	0,37	0,56	1,00	0,76
<b>Operation wegen MC</b> <sup>2</sup>	68 (56,2%)	45 (66,2%)	10 (58,8%)	0,21	1,00	0,58	1,00
<b>Fisteln</b>	61 (50,4%)	40 (58,8%)	9 (52,9%)	0,29	1,00	0,78	1,00
<b>Stenosen</b> <sup>3</sup>	78 (64,5%)	46 (67,6%)	15 (88,2%)	0,75	0,06	0,13	<b>0,06</b>
<b>Abszesse</b>	42 (34,7%)	27 (39,7%)	7 (41,2%)	0,53	0,59	1,00	0,79
<b>Extraintestinale Manifestationen</b>	87 (71,9%)	38 (55,9%)	13 (76,5%)	0,04	0,78	0,17	0,59
<b>CED in der Familie</b>	15 (12,4%)	11(16,2%)	1 (5,9%)	0,51	0,69	0,44	0,70

**Tab. 16** Assoziation des V249I-Polymorphismus mit M. Crohn-Merkmalen. <sup>1</sup> Die Kategorie „Immunsuppressiva“ beinhaltet Azathioprin, 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin, Methotrexat und/oder Infliximab. <sup>2</sup> Als Operationen wurden nur M. Crohn-spezifische Behandlungen eingeschlossen. <sup>3</sup> Die Diagnose einer Stenose wurde chirurgisch, endoskopisch oder radiologisch gestellt.

	(1) TT (n=149)	(2) TM (n=48)	(3) MM (n=9)	(1) vs. (2) p - Wert	(1) vs. (3) p - Wert	(2) vs. (3) p - Wert	(1+2) vs. (3) p - Wert
<b>Männlich</b>	66 (44,3%)	26 (54,2%)	5 (55,5%)	0,24	0,73	1,00	0,73
<b>Body mass index</b> (kg/m <sup>2</sup> )	23,0±3,9	23,1±4,1	22,4±3,2	0,86	0,60	0,56	0,58
<b>Alter bei Diagnose (J)</b>  Mittelwert ± SD  Bereich	27,6±11,5  7-71	28,1±12,4  12 – 66	26,9(8,4  17 - 40	0,81	0,81	0,72	0,77
<b>Krankheitsdauer (J)</b>	11,3(8,3	10,5(7,9	13,0(9,0	0,49	0,62	0,45	0,57
<b>Alter</b>  < 40 Jahre (A1)  > 40 Jahre (A2)	128 (85,9%)  21 (14,1%)	41 (85,4%)  7 (14,6%)	8 (88,9%)  1 (11,1%)	1,00	1,00	1,00	1,00
<b>Lokalisation</b>  Terminales Ileum (L1)  Kolon (L2)  Ileokolon (L3)  Oberer GI (L4)	29 (19,5%)  23 (15,4%)  73 (49,0%)  24 (16,1%)	11 (22,%  11 (22,9%)  17 (35,4%)  9 (18,8%)	1 (11,1%)  0 (0%)  8 (88,9%)  0 (0%)	0,68  0,27  0,13  0,66	1,00  0,35  <b>0,03</b>  0,35	0,66  0,18  <b>0,007</b>  0,32	0,69  0,36  <b>0,01</b>  0,36
<b>Ausprägung</b>  Keine Striktur, nicht penetrierend (B1)  Striktur (B2)  penetrierend (B3)	29 (19,4%)  26 (17,5%)  94 (63,1%)	9 (18,8%)  11 (22,9%)  28 (58,3%)	0 (0%)  3 (33,3%)  6 (66,7%)	1,00  0,52  0,60	0,21  0,36  0,09	0,32  0,67  0,72	0,21  0,38  0,73



<b>Immunsuppressiva</b>	113 (75,8%)	39 (81,2%)	7 (77,8%)	0,55	1,00	1,00	1,00
<b>Operation wegen MC</b>	89 (59,7%)	28 (58,3%)	6 (66,7%)	0,86	1,00	0,72	0,74
<b>Fisteln</b>	80 (53,7%)	24 (50,0%)	6 (66,7%)	0,74	0,51	0,47	0,50
<b>Stenosen</b>	99 (66,4%)	31 (64,6%)	9 (100,0%)	0,86	<b>0,05</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>
<b>Abszesse</b>	51 (34,2%)	21 (43,7%)	4 (44,4%)	0,30	0,72	1,00	0,72
<b>Extraintestinale Manifestationen</b>	98 (65,8%)	33 (68,7%)	7 (77,8%)	0,86	0,71	0,71	0,72
<b>CED in der Familie</b>	19 (12,7%)	8 (16,7%)	0 (0%)	0,47	0,60	0,33	0,60

**Tab. 17:** Assoziation des T280M-Polymorphismus mit M. Crohn-Merkmalen.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Phänotypische Auswirkungen der CX3CR1-Polymorphismen**

Durch die Entdeckung von *NOD2/CARD15* als Suszeptibilitätsgen für den M. Crohn wurden zum ersten Mal phänotypische Merkmale des M. Crohn (Krankheitslokalisation und Erkrankungsausmaß) mit objektiven, genetischen Markern in Verbindung gebracht. Bestimmte Polymorphismen im *NOD2/CARD15*-Gen waren mit einem erhöhten Risiko für stenosierenden Verlauf im terminalen Ileum assoziiert (Hugot J.P. et al. 2001, Ogura Y. et al. 2001). Da allerdings nur eine Minderheit der Patienten mit M. Crohn von *NOD2/CARD15*-Veränderungen betroffen ist, wird ersichtlich, dass die Krankheitspathogenese heterogen ist und dass zusätzliche genetische Marker identifiziert werden müssen, die die Krankheitssuszeptibilität beschreiben können.

In unserer Arbeit wurden Polymorphismen des Rezeptors für das Chemokin Fractalkin (CX3CR1) auf Suszeptibilität und Phänotypentwicklung des M. Crohn näher untersucht. Die Ergebnisse zeigten beim Vergleich von 201 M. Crohn-Patienten zu 211 Kontroll-Personen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Häufigkeit der untersuchten Polymorphismen. Dieses Ergebnis wurde in einer aktuellen Meta-Analyse, die alle bisherigen genomweiten Assoziationsstudien zum M. Crohn zusammenfasste bestätigt (Barrett et al. 2008). Allerdings fand sich ein Zusammenhang zwischen phänotypischen Merkmalen und den untersuchten CX3CR1-Polymorphismen: Bei allen Patienten, die homozygot für den Polymorphismus T280M waren, konnte eine Beteiligung des Ileums nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei Personen mit isoliertem Auftreten der Krankheit im Bereich des Kolons der homozygote Genotyp nicht gefunden. Eine Manifestation der Krankheit im Ileokolon war bei homozygoten T280M-Merkmalsträgern im Vergleich zu heterozygoten Trägern oder dem Wildtyp signifikant erhöht. Allerdings trat der T280M-Polymorphismus homozygot nur bei 4,4% der Erkrankten auf, so dass dies für einen Großteil der Patienten nicht von gleicher Relevanz wie die relativ häufige *NOD2/CARD15*-Mutation ist. Aufgrund des geringen Prozentanteils der homozygoten Träger für T280M, ist die in dieser Studie verwendete Fallzahl von 206 Patienten relativ gering. Um konkrete Aussagen treffen zu können, müsste diese wesentlich erhöht werden, z.B. im Rahmen einer Multicenter-Studie. Die bevorzugte Manifestation des M. Crohn im

Ileum bei homozygotem T280M-Merkmalsträgern könnte potentiell durch die erhöhte Expression von Fractalkin in dieser Region erklärt werden. Schon durch andere Studien wurde gezeigt, dass Fractalkin - verglichen mit dem restlichen Gastrointestinaltrakt - im Ileum vermehrt exprimiert wird (Muehlhoefer A. et al. 2000, Niess J.H. et al. 2005). Außerdem war T280M signifikant mit Stenosen assoziiert, d. h. diese wurden bei allen homozygoten T280M-Trägern diagnostiziert. Bezüglich des V249I-Polymorphismus konnten ähnliche Trends gefunden werden, d. h. eine Beteiligung des Ileokolons sowie die Entstehung von Stenosen traten bei homozygoten Merkmalsträgern vermehrt auf. Vergleichbare Resultate erzielte eine ähnliche, von Sabate J. M. et al. durchgeführte Studie (Sabate J.M. et al. 2008), Hier wurde ebenso CX3CR1 in Abhängigkeit von M. Crohn untersucht. Ein Unterschied bezüglich der Häufigkeit der CX3CR1-Polymorphismen zur Normalbevölkerung konnte auch hier nicht festgestellt werden. Bei Patienten mit V249I Polymorphismus, zu dem ein „linkage disequilibrium“ zum T280M-Polymorphismus besteht, zeigte sich ein signifikant erhöhter stenosierender Krankheitsverlauf, insbesondere bei Rauchern.

#### **4.2 Limitationen der Vienna-Klassifikation bei der Phänotypisierung von M. Crohn-Patienten**

Zur Bearbeitung der Phänotyp-Genotyp-Korrelation in dieser Arbeit wurde die Vienna-Klassifikation herangezogen (Gasche C. et al. 2000). Schon die Autoren dieser Klassifikation wiesen darauf hin, dass Kompromisse eingegangen werden mussten und potentiell wichtige Kriterien nicht mit in die Einteilung einbezogen werden. Diese Problematik äußerte sich auch bei der Einteilung der Patienten in der vorgelegten Studie in die entsprechenden Gruppen. Die Systematik der Vienna-Klassifikation erlaubt durch seine Gliederung oft nur eine bedingte Vollständigkeit des Beschwerdebilds (Gasche C. et al. 2000). Das Ausmaß des M. Crohn, das durch die Klassifikation beschrieben werden soll, lässt sich so nicht vollständig darstellen. Auch die Häufigkeit der entsprechenden Ereignisse, wie Stenosen oder Fisteln, wird nicht erfasst. Die Trennung zwischen „Lokalisation“ und „Ausprägung“ lässt auch keinen Schluss zu, welcher Bereich wie schwer betroffen ist.

Bei der Beurteilung der Lokalisation bereite auch der Parameter „L4“, also oberer Gastrointestinaltrakt (oberer GI), gewisse Schwierigkeiten. Er ist definiert als „Lokalisation oberhalb des terminalen Ileums, mit oder ohne Beteiligung von terminalem Ileum oder Kolon“. Der Parameter „L4“ ist somit nicht aussagekräftig, ob der obere GI-Trakt allein betroffen bzw. welcher weitere Abschnitt zusätzlich erkrankt ist. Für „Lokalisation“ musste natürlich ein konkreter Zeitpunkt ausgewählt werden. Man einigte sich auf „das maximale Ausmaß der Erkrankung vor der ersten Resektion“ (Gasche C. et al. 2000). Da aber oftmals danach weitere Manifestationen auftreten, wird auch hier die Problematik der Vienna-Klassifikation deutlich. Dennoch lässt sich feststellen, dass die Lokalisation über die Krankheitsdauer betrachtet, relativ stabil bleibt. Retrospektive Studien haben aber gezeigt, dass gewisse Befallsmuster eine Assoziation mit der Schwere der Erkrankung haben. Während eine Beteiligung des Ileums und des anoperinealen Bereichs früh zu Stenosen und/oder penetrierendem Verlauf führt, verläuft eine isolierte Colitis relativ unkompliziert. Eine Manifestation im oberen GI-Trakt wurde sogar als protektiver Faktor gegen eine weitere Krankheitsaggravierung nachgewiesen (Cosnes J. et al. 2002).

Die strikte Untergliederung in stenosierend (B2) oder penetrierend (B3) erlaubte keine detaillierten Rückschlüsse auf den bisherigen Krankheitsverlauf. Durch das Vorliegen eines penetrierenden Verlaufs wurde automatisch der „B3“-Status erteilt. Eventuell zuvor oder gleichzeitig bestandene Stenosen wurden nicht berücksichtigt. Die relativ starre Klassifikation wird auch dem Charakter des M. Crohn nicht ganz gerecht. Wenn man Patienten mit M. Crohn länger beobachtet, stellt sich heraus, dass das momentane Beschwerdebild sehr dynamisch ist. Langzeitstudien haben gezeigt, dass die meisten M. Crohn-Patienten im Laufe ihres Lebens einen stenosierenden oder penetrierenden Verlauf ausbilden. Somit darf man hier den Verlauf nicht als konstante, sondern vorübergehende Qualität betrachten (Cosnes J. et al. 2002, Louis E. et al. 2001).

Nach Abschluss unserer Studie wurde auf dem „World Congress of Gastroenterology“ in Montreal 2005 versucht, eine neue Klassifikation zu erstellen, die mehrere zusätzliche Parameter mit einschließen soll.

Es wurde eine zusätzliche Altersklasse „A1= 16 Jahre oder jünger“ eingeführt, da sich Kinder oft in genotypischen und phänotypischen Merkmalen, insbesondere in der Krankheitsschwere von den Erwachsenen unterscheiden. Die Lokalisation L4

wird nicht mehr isoliert betrachtet, sondern kann jetzt auch in Kombination mit anderen Manifestationen dokumentiert werden (Silverberg M. S. et al. 2005).

Das Befallsverhalten bereitete nach wie vor Schwierigkeiten. Man einigte sich hier darauf, eine Zuordnung erst 5-10 Jahre nach Diagnose vorzunehmen, da die meisten M. Crohn-Patienten innerhalb dieses Zeitraums eine Stenose (B2) oder einen penetrierenden Verlauf (B3) gezeigt hatten (Loius E. et al 2001). Die Ausbildung einer perianalen Fistel wurde aus „B3“ herausgenommen, da 80% der Patienten mit perianalem Befall keine Fisteln im restlichen Intestinum entwickelten (Silverberg M. S. et al. 2005).

Hauptgruppen	Untergliederung	Definition
<b>Alter bei Diagnose (=A)</b>	<b>A1</b>	<b>16 Jahre oder jünger</b>
	A2	17-40 Jahre
	A3	Über 40 Jahre
<b>Lokalisation (=L)</b>	L1	Terminales Ileum
	L2	Kolon
	L3	Ileokolon
	L4	Oberer GI-Trakt
	<b>L4, modifiziert</b>	<b>L1+L4, L2+L4, L3+L4</b>
<b>Ausprägung (=B)</b>	<b>B1*</b>	Keine Stenose, nicht penetrierend
	B2	Stenose
	B3	Penetrierend
<b>Perianaler Befall, modifiziert (=p)</b>	<b>B1p</b>	Keine Stenose, nicht penetrierend + perianaler Befall
	<b>B2p</b>	Stenose + perianaler Befall
	<b>B3p</b>	Penetrierend + perianaler Befall

**Tab. 18:** Zusammenfassung der überarbeiteten „Montreal-Klassifikation“ des M. Crohn (Silverberg M. S. et al. 2005). Die wesentlichen Veränderungen zur Vienna-Klassifikation sind grün hinterlegt.

\* Diese Kategorie sollte unter Vorbehalt betrachtet werden, bis eine gewisse Zeit nach Diagnosestellung vergangen ist. Je nach Studie wird hierfür ein Zeitraum von 5-10 Jahren angegeben (Louis E. et al 2001).

#### **4.3 Die Rolle des Fractalkin-Rezeptors bei der Phagozytosefunktion dendritischer Zellen**

Die hier beobachtete Assoziation mit einem ilealen Phänotyp scheint auf einen Effekt von CX3CR1 auf ileale dendritische Zellen (DCs) zu beruhen, da die Funktion von DC durch Fractalkin und seinem Rezeptor beeinflusst wird. Die Antigen-präsentierenden DC gewährleisten eine Immunität gegenüber Pathogenen und eine Toleranz bezüglich körpereigener Antigene. Somit nehmen sie eine tragende Rolle in der Immunantwort und der Kontrolle von Entzündungen ein. Vor allem in der Lamina propria treten sie in Kontakt mit Antigenen und sind für den Abtransport von bakteriellen Produkten sowie Proteinen verantwortlich (Niess J. H. et al. 2005).

Versuche mit CX3CR1-Knock-out-Mäusen haben gezeigt, dass CX3CR1-positive DC dendritische Ausläufer in und durch das Darmepithel bilden, um luminaire bakterielle Antigene aufzunehmen. Die Entstehung dieser transepithelialen Ausläufer trat bei den CX3CR1-Knock-out-Mäusen nicht auf. Dies lässt den Schluss zu, dass die Formation dieser Strukturen von einer Interaktion zwischen CX3CR1 mit den intestinalen Epithelzellen abhängig ist. Allerdings wurden diese Verzweigungen nur in Villi des terminalen Ileum beobachtet, nicht jedoch im Duodenum, Jejunum, proximalem oder mittlerem Ileum (Niess J. H. et al. 2005).

#### **4.4 Intestinale bakterielle Clearance als Pathogenese-Faktor**

Durch die Entdeckung von *NOD2/CARD15* als M. Crohn-Suszeptibilitätsgen wurde bestätigt, dass die Interaktion mit intestinalen Bakterien die Pathogenese des M. Crohn beeinflusst. Die Funktion des Gens besteht zum einen in einer

Regulation der Apoptose und zum anderen in der Identifizierung mikrobieller Produkte (Elson C.O. 2002). *CARD15* kodiert einen intrazellulären Rezeptor, der Muramyl-Dipeptid erkennt, eine Substanz, die in Zellwänden gram-positiver und gram-negativer Bakterien gefunden wird (Girardin S. E. et al. 2003, Inohara N. et al. 2003).

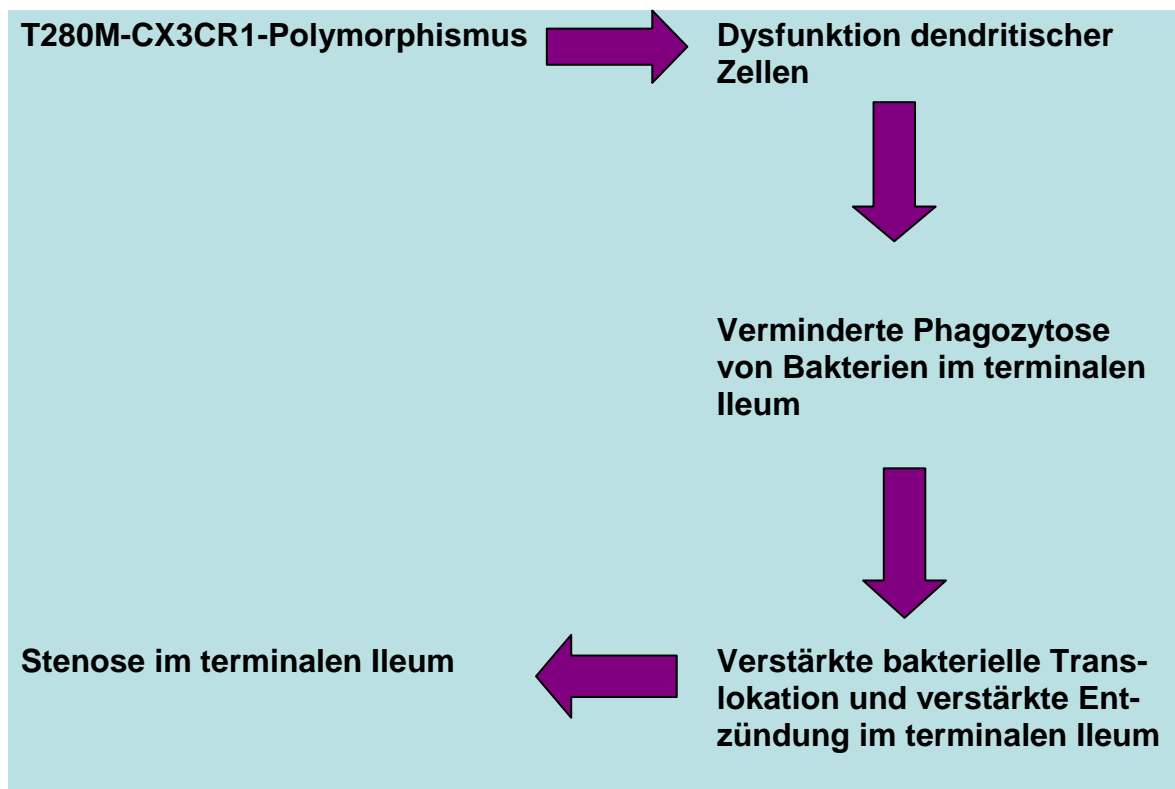
Da intestinale DC an der Kontrolle der bakteriellen Mikroflora beteiligt sind, liegt es nahe, dass Störungen in diesem Gefüge die Entstehung und den Verlauf eines M. Crohn wesentlich beeinflussen können. Die CX3CR1-abhängige Fähigkeit der DC, sowohl die normale Darmflora als auch enteropathogene Keime aufzunehmen, wurde auch mittels Knock-out-Mäusen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass mikrobielle Produkte nur in CX3CR1+-Tieren in die Lamina propria transportiert wurden. Dies wirkt sich auch auf die erfolgreiche Abwehr von Infektionen aus, da durch die DC einem bakteriellen Überschuss im Darmlumen entgegengewirkt wird. Die hierfür notwendige Ausbildung von transepithelialen Ausläufern der DC bleibt bei den Knock-out-Mäusen aus. Diese Strukturen fungieren aber als wichtiger Sensor der DC und gewährleisten somit eine ausgewogene Besiedelung des Darms mit Bakterien (Niess J. H. et al. 2005).

#### **4.5 Veränderte Rezeptorfunktion durch CX3CR1-Polymorphismen**

Die vermehrten Stenosen und Manifestationen am Ileum bei bestimmten Polymorphismustypen lassen sich durch eine eventuell veränderte Funktionsfähigkeit des Rezeptors z.B. bei der Phagozytosefunktion von DCs erklären. In vitro Studien haben gezeigt, dass die V249I-T280M Aminosäuresubstitution Folgen für die Funktion von CX3CR1 hat (Daoudi M. et al. 2004). Die genauere Analyse dieser Polymorphismen hat ergeben, dass Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) bei Individuen mit I249-M280 Genotyp eine größere Adhärenz für membrangebundenes Fractalkin zeigen, als die Monozyten von Personen, die homozygot für CX3CR1-VT (= Wildtyp) waren. Welche strukturellen Veränderungen letztendlich zu dieser Funktionsabweichung führen, ist nicht sicher geklärt (Daoudi M. et al. 2004). Einerseits könnte ein I249 Genotyp mit einer Mutation in der Promoterregion einhergehen und somit zu einer veränderten Expression von CX3CR1 führen (DeVries et al. 2003). Prinzipiell kommt auch eine veränderte Rezeptorkonformation als Ursache in Betracht. Bei G-Protein-

gekoppelten Rezeptoren wird dies oft durch Drehungen der Helices 6 und 7 erreicht. In diesen Regionen sind die Mutationen von CX3CR1 lokalisiert.

In wie weit diese Polymorphismen auch einen Einfluss auf die beim M. Crohn wichtigen DC und somit auf deren Funktion bezüglich Bakterien ausüben, muss noch weiter untersucht werden. Die Versuche mit CX3CR1-Knock-out-Mäusen haben den Einfluss von CX3CR1 auf die DC schon bewiesen: Die geringere intraepitheliale Ausbildung von Ausläufern der DC resultierte in einer verminderten Aufnahme von Bakterien aus dem Darmlumen durch die DC (Niess J. H. et al. 2005). Ob sich Polymorphismen von CX3CR1 auf dieses System auswirken, steht allerdings noch nicht fest. Jedoch könnte eine funktionelle Einschränkung der dendritischen Zellen durch eine erhöhte Exposition der intestinalen Epithelzellen mit Bakterien zu einer Zunahme der Entzündungsaktivität mit der Folge von Stenosenbildungen führen. Dieses naheliegende Pathogenese-Konzept des M. Crohn ist in Abbildung 8 zusammengefasst.



**Abb. 8:** Hypothese zum Einfluss von T280M-CX3CR1-Polymorphismen auf den M. Crohn-Krankheitsphänotyp.



#### **4.6 Bedeutung von CX3CR1-Polymorphismen bei anderen Erkrankungen**

Die Vermutung, dass Fractalkin und sein Rezeptor eine wichtige Rolle während einer Entzündung im Darm spielen könnte, wurde auch schon von Muehlhoefer et al. geäußert (Muehlhoefer A. et al. 2000). Sie beschrieben in ihren Versuchen eine Zunahme der Fractalkin-mRNA-Expression in der Schleimhaut von Patienten mit M. Crohn. Die Entdeckung, dass die Zelllinie T84 in der Lage war, freies und membrangebundenes Fractalkin nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  zu produzieren, führte zu der Annahme, dass es für die Koordination von CX3CR1+-exprimierenden Lymphozyten des intestinalen Epithels und der intestinalen Lamina propria von Wichtigkeit ist (Muehlhoefer A. et al. 2000). Eine weitere wesentliche Funktion von Fractalkin, die einen Beitrag zum Entzündungsprozess leisten könnte, scheint auch das Abfangen von Leukozyten und die Induktion einer festen Adhäsionsfähigkeit peripherer CD8+-T Zellen, Monozyten und NK Zellen zu sein. Diese Effekte werden nur durch die Interaktion mit dem Rezeptor CX3CR1 erreicht, d. h. die Anwesenheit von Integrinen oder anderer Adhäsionsmolekülen ist nicht zwingend nötig. Dieser Unterschied zu anderen Chemokinen wird wahrscheinlich durch den Mucin-Rest innerhalb des Fractalkin-Proteins bewirkt (Fong A. M. et al. 1998).

Polymorphismen von CX3CR1 beeinflussen auch den Verlauf anderer Krankheiten, an deren Entstehung Komponenten des Immunsystems beteiligt sind. Eine Studie, in der Patienten mit HIV untersucht wurden, zeigte für CX3CR1-Polymorphismen eine maßgebliche Rolle bei der Krankheitsprogression. Bei Patienten, die homozygot für I249-M280 waren, entwickelte sich das AIDS-Endstadium deutlich schneller, als bei allen anderen Genotypen (Faure S. et al. 2000).

Auch die Beteiligung von CX3CR1 bei der Atherosklerose wurde bereits nachgewiesen. Individuen, die heterozygot für I249 waren, zeigten ein bei weitem geringeres Risiko für eine Koronararteriosklerose. Bei CX3CR1-Knock-out-Mäusen bestand weiterhin eine herabgesetzte Adhäsion von Makrophagen an die Zellwand und somit eine reduzierte Gefahr der Ausbildung einer Läsion, die eine Atherosklerose begünstigen könnte (McDermott D. H. et al. 2001).

Weiterhin konnte ein Einfluss von CX3CR1 bei der Progredienz zur Fibrose bei Hepatitis C nachgewiesen werden. Die Träger des I-Allels zeigten eine stärkere Fibroseausprägung als homozygote Träger des V-Allels. Patienten mit schwerer

Progression waren vermehrt Träger des I-Allels, verglichen mit den Personen mit leichterem Verlauf (Wasmuth H.E. et al. 2004).

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der V249I- und T280M-Polymorphismen auf die Krankheitssuszeptibilität und den Phänotyp des M. Crohn durch den Einsatz von Restriktionslängenpolymorphismen untersucht. Unsere Hypothese ging von der Annahme aus, dass Polymorphismen von CX3CR1 über eine Dysfunktion von dendritischen Zellen in der Lamina propria zur verminderten Phagozytose von Bakterien im terminalen Ileum führen (Niess J.H. et al. 2005). Dadurch wird dort eine verstärkte Entzündung getriggert, die im weiteren Verlauf zur Ausbildung von Stenosen führen kann (siehe Abb. 8). Mehrere Studien haben bewiesen, dass der Fractalkin-Rezeptor CX3CR1 in das Immun- und Entzündungsgeschehen miteinbezogen ist (Faure S. et al. 2000, McDermott D. H. et al. 2001). Insgesamt konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass bezüglich der Häufigkeit der beiden CX3CR1-Polymorphismen kein signifikanter Unterschied zwischen der Normalbevölkerung und Patienten mit M. Crohn zu finden war, d. h. kein Einfluss auf die Krankheitssuszeptibilität vorliegt. Der Vergleich der Genotypen mit den phänotypischen Eigenschaften der verschiedenen Personen erfolgte anhand der Vienna-Klassifikation (Gasche C. et al. 2000) und ergab für homozygote Träger des T280M-Polymorphismus eine signifikant häufigere Manifestation im Ileokolon und eine erhöhte Stenoseprävalenz. Bezüglich des V249I-Polymorphismus konnten ähnliche Trends im Sinne einer vermehrten Beteiligung des Ileokolons sowie gehäufte Stenosen bei homozygoten Merkmalsträgern gefunden werden. Dennoch muss man, wie schon bereits erwähnt, das Resultat aufgrund des niedrigen prozentualen Anteils am Gesamtkollektiv kritisch betrachten. Obwohl unsere Ergebnisse denen aus der Studie von Sabat J. M. et al. 2004 ähneln, wären größere Untersuchungen notwendig, um die Ergebnisse endgültig zu bestätigen. Aufgrund der relativ geringen Häufigkeit von homozygoten Merkmalsträgern, ist dies jedoch nur als Multicenterstudie möglich.

In welcher Art und Weise diese Polymorphismen außerdem einen Einfluss auf die Pathogenese des M. Crohn nehmen, bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen. Studien, die z. B. einen Zusammenhang mit der Dysfunktion von intestinalen dendritischen Zellen bei bestimmten Polymorphismustypen aufdecken würden, wären notwendig. Damit wäre zu analysieren, ob bei diesen Genotypen eventuell die Fähigkeit der dendritischen Zellen, die Bakteriendichte im Darmlumen zu

kontrollieren, eingeschränkt ist und somit die Gefahr einer erhöhten bakteriellen Translokation mit verstärkter Entzündungsaktivität besteht. Ein derartiger Zusammenhang wäre auch eine Erklärung für den von uns für Träger des T280M-Polymorphismus gefundenen Befall des terminalen Ileums mit verstärkter Stenosebildung.

## **6. ANHANG**

### **6.1 Literaturverzeichnis**

**Adler G, Reinshagen M.**

[Extraintestinal manifestations]

*Z Gastroenterol.* 2003 Jan;41(1):54-61.

**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.

**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.

**Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D.**

Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes.

*J Exp Med.* 2003 Jun 16;197(12):1701-7.

**Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS, Taylor KD, Barmada MM, Bitton A, Dassopoulos T, Datta LW, Green T, Griffiths AM, Kistner EO, Murtha MT, Regueiro MD, Rotter JI, Schumm LP, Steinhardt AH, Targan SR, Xavier RJ; NIDDK IBD Genetics Consortium, Libioulle C, Sandor C, Lathrop M, Belaiche J, Dewit O, Gut I, Heath S, Laukens D, Mni M, Rutgeerts P, Van Gossum A, Zelenika D, Franchimont D, Hugot JP, de Vos M, Vermeire S, Louis E; Belgian-French IBD Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon LR, Anderson CA, Drummond H, Nimmo E, Ahmad T, Prescott NJ, Onnie CM, Fisher SA, Marchini J, Ghorri J, Bumpstead S, Gwilliam R, Tremelling M, Deloukas P, Mansfield J, Jewell D, Satsangi J, Mathew CG, Parkes M, Georges M, Daly MJ.**

Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease.

*Nat Genet.* 2008 Aug;40(8):955-62.

**Barnich N, Aguirre JE, Reinecker HC, Xavier R, Podolsky DK.**

Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition.

*J Cell Biol.* 2005 Jul 4;170(1):21-6.

**Barton JR, Gillon S, Ferguson A.**

Incidence of inflammatory bowel disease in Scottish children between 1968 and 1983; marginal fall in ulcerative colitis, three-fold rise in Crohn's disease.

*Gut.* 1989 May;30(5):618-22.

**Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ.**

A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.  
*Nature*. 1997 Feb 13;385(6617):640-4.

**Bouvier M.**

Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors.  
*Nat Rev Neurosci*. 2001 Apr;2(4):274-86.

**Brand S, Sakaguchi T, Gu X, Colgan SP, Reinecker HC.**

Fractalkine-mediated signals regulate cell-survival and immune-modulatory responses in intestinal epithelial cells.  
*Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):166-77.

**Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ.**

In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis.  
*Gut*. 2002 Jul; 51(1): 21-5.

**Chapman GA, Moores KE, Gohil J, Berkhout TA, Patel L, Green P, Macphee CH, Stewart BR.**

The role of fractalkine in the recruitment of monocytes to the endothelium.  
*Eur J Pharmacol*. 2000 Mar 31;392(3):189-95.

**Cho JH, Weaver CT.**

The genetics of inflammatory bowel disease.  
*Gastroenterology*. 2007 Oct;133(4):1327-39. Review.

**Chollet-Martin S, Montravers P, Gibert C, Elbim C, Desmonts JM, Fagon JY, Gougerot-Pocidalo MA.**

High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome.  
*Infect Immun*. 1993 Nov;61(11):4553-9.

**Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, Gendre JP.**

Long-term evolution of disease behaviour of Crohn's disease.  
*Inflamm Bowel Dis*. 2002 Jul;8(4):244-50.

**Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD.**

Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer.  
*JAMA*. 1984 Jan 6;251(1):73-9. (Nachdruck des Originalartikels)

**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.

**Cybulsky MI, Hegele RA.**

The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis.  
*J Clin Invest.* 2003 Apr;111(8):1118-20.

**Dalziel TK.**

Thomas Kennedy Dalziel 1861-1924. Chronic interstitial enteritis  
*Dis Colon Rectum.* 1989 Dec;32(12):1076-8.

**Daoudi M, Lavergne E, Garin A, Tarantino N, Debre P, Pincet F, Combadiere C, Deterre P.**

Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1.  
*J Biol Chem.* 2004 May 7;279(19):19649-57.

**Decaillot FM, Befort K, Filliol D, Yue S, Walker P, Kieffer BL**

Opioid receptor random mutagenesis reveals a mechanism for G protein-coupled receptor activation.  
*Nat Struct Biol.* 2003 Aug;10(8):629-36.

**DeVries ME, Cao H, Wang J, Xu L, Kelvin AA, Ran L, Chau LA, Madrenas J, Hegele RA, Kelvin DJ.**

Genomic organization and evolution of the CX3CR1/CCR8 chemokine receptor locus.  
*J Biol Chem.* 2003 Apr 4;278(14):11985-94.

**Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH.**

A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene.  
*Science.* 2006 Dec 1;314(5804):1461-3.

**Dwinell MB, Johanesen PA, Smith JM.**

Immunobiology of epithelial chemokines in the intestinal mucosa.  
*Surgery.* 2003 Jun;133(6):601-7.

**Ekbom A.**

The epidemiology of IBD: a lot of data but little knowledge. How shall we proceed?  
*Inflamm Bowel Dis.* 2004 Feb;10 Suppl 1:S32-4.

**Elson CO.**

Genes, microbes, and T cells- new therapeutic targets in Crohn's disease.  
*N Engl J Med.* 2002 Feb 21; 346(8):614-616.

**Elson CO, Cong Y, Weaver CT, Schoeb TR, McClanahan TK, Fick RB, Kastelein RA.**

Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice.  
*Gastroenterology.* 2007 Jun;132(7):2359-70.

**Evans JM, McMahon AD, Murray FE, McDevitt DG, MacDonald TM.**

Non-steroidal anti-inflammatory drugs are associated with emergency admission to hospital for colitis due to inflammatory bowel disease.

*Gut*. 1997 May; 40(5):619-622.

**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

**Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P, Theodorou I, Combadiere C.**

Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1.

*Science*. 2000 Mar 24;287(5461):2274-7.

**Feller AC, Merz H.**

Grundlagen der Immunreaktion.

In: Böcker W, Denk H, Heitz P. *Pathologie 3.Auflage*.

München: Urban und Fischer Verlag (Elsevier GmbH), 2004: 111-146.

**Fiocchi C.**

Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis.

*Gastroenterology*. 1998 Jul;115(1):182-205.

**Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD.**

Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow.

*J Exp Med*. 1998 Oct 19;188(8):1413-9.

**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.

**Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ.**

Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.

*J Biol Chem*. 2003 Mar 14;278(11):8869-72.

**Glas J, Seiderer J, Wetzke M, Konrad A, Török HP, Schmechel S, Tonenchi L, Grassl C, Dambacher J, Pfennig S, Maier K, Griga T, Klein W, Epplen JT, Schiemann U, Folwaczny C, Lohse P, Göke B, Ochsenkühn T, Müller-Myhsok B, Folwaczny M, Mussack T, Brand S.**

rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants.

*PLoS ONE*. 2007 Sep 5;2(9):e819.



**Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Günther S, Prescott NJ, Onnie CM, Häsler R, Sipos B, Fölsch UR, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S.**

A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1.

*Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):207-11.

**Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard 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.

**Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiya H, Schall TJ, Yoshie O.**

Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion.

*Cell.* 1997 Nov 14;91(4):521-30.

**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, Nuñez G.**

Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease.

*J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278(8):5509-12.

**Kirsner JB.**

Historical aspects of inflammatory bowel disease.

*J Clin Gastroenterol.* 1988 Jun;10(3):286-97.

**Koutrobakis I, Manousos ON, Mewwissen SGM, Pena AS.**

Environmental risk factors in inflammatory bowel disease.

*Hepatogastroenterology.* 1996 Mar-Apr; 43(8):381-393.

**Lahrtz F, Piali L, Nadal D, Pfister HW, Spanaus KS, Baggiolini M, Fontana A.**

Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon-gamma inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1.

*Eur J Immunol.* 1997 Oct;27(10):2484-9.

**Lesage S, Zouali H, Cézard 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.

**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.

**Luster AD.**

Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation.  
*N Engl J Med*. 1998 Feb 12;338(7):436-45.

**McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM.**

Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis.  
*Circ Res*. 2001 Aug 31;89(5):401-7.

**MacDermott RP.**

Chemokines in the inflammatory bowel diseases.  
*J Clin Immunol*. 1999 Sep;19(5):266-72.

**MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC.**

The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease.  
*Inflamm Bowel Dis*. 1998 Feb;4(1):54-67.

**Madsen KL.**

Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse.  
*Clin Invest Med*. 2001 Oct;24(5):250-7.

**Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishmann MC.**

Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor.  
*Science* 1996 Oct 11; 274(5285) :262-5.

**Meng EC, Bourne HR**

Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us?  
*Trends Pharmacol Sci*. 2001 Nov;22(11):587-93.

**Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC.**

Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa.  
*J Immunol*. 2000 Mar 15;164(6):3368-76.

**Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC.**

CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance.  
*Science*. 2005 Jan 14;307(5707):254-8.

**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, Nuñez G, Cho JH.**

A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.  
*Nature*. 2001 May 31;411(6837):603-6.

**Papadakis KA.**

Chemokines in inflammatory bowel disease.  
*Curr Allergy Asthma Rep*. 2004 Jan;4(1):83-9.

**Podolsky DK.**

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

**Rossi D, Zlotnik A.**

The biology of chemokines and their receptors.  
*Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42.

**Sabate JM, Ameziane N, Lamoril J, Jouet P, Farmachidi JP, Soulé JC, Harnois F, Sobhani I, Jian R, Deybach JC, de Prost D, Coffin B.**

The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease.  
*Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008 Aug;20(8):748-55.

**Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD.**

Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis.  
*Gastroenterology*. 1999 Feb; 116(2):301-9.

**Schnitzler F, Brand S, Staudinger T, Pfennig S, Hofbauer K, Seiderer J, Tillack C, Goke B, Ochsenkuhn 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 Apr;58(2-3):99-106.

**Schreiber S, Hanpe J, Nikolaus S, Foelsch UR.**

Review article : exploration of the genetic aetiology of inflammatory bowel disease-implications for diagnosis and therapy.  
*Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Oct;20 Suppl 4:1-8.

**Sentongo TA, Semeao EJ, Piccoli DA, Stallings VA, Zemel BS.**

Growth, body composition, and nutritional status in children and adolescents with Crohn's disease.  
*J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000 Jul;31(1):33-40.

**Shanahan F.**

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

**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.

**Siegmund B, Zeitz M.**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

In: *Dietel M, Suttrop N, Zeitz M. Harrisons Innerer Medizin, 16. Edition.*

Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH, 2005: 1911-1924.

**Timmer A, Breuer-Katschinsky B, Goebell H.**

Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany.

*Inflamm Bowel Dis*. 1999 May; 5(2):79-84.

**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.

**Wasmuth HE, Werth A, Hillebrandt S, Müller T, Berg T, Geier A, Dietrich CG, Matern S, Lammert F.**

Assoziation des Chemokinrezeptors CX3CR1 mit der Leberfibrose bei chronischer Hepatitis C Infektion.

59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, September 1-4, 2004, Leipzig

*Z Gastroenterol* 2004;42.

**Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D.**

IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6.

*J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1310-6.

**Zlotnik A, Yoshie O.**

Chemokines: a new classification system and their role in immunity.

*Immunity*. 2000 Feb;12(2):121-7.

**6.2. Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
AS	Aminosäure
ASCA	Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -antibodies
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
bp	base pair = Basenpaare
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
C	Cytosin
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CD	Cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CRP	C-reaktives Protein
CTLA-4 Antigen	Anti-cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4
CU	Colitis ulcerosa
CX3CL1	Fractalkin (engl. <i>fractalkine</i> )
DC	Dendritic cell
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ENA-78	Epithelial cell derived neutrophil activating peptide 78
ERK	Extracellular signal regulated kinase
G	Guanin (-nucleotide)
GI	Gastrointestinaltrakt
IBD	Inflammatory bowel disease
IEC	Intestinal epithelial cell

IL	Interleukin
IP-10	Interferon inducible protein-10
J	Jahre
Kb	Kilobase
Kd	Kilo dalton
M	Molar
MC	Morbus Crohn
MCP	Monocyte chemotactic protein
MDP	Muramyl-dipeptid
MIP	Macrophage inflammatory protein
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NOD	Nucleotide oligomerization domain
pANCA	Perinukleäre antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
PBMC	Peripheral blood monocyte cell
PCR	Polymerase chain reaction
RANTES	Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted
mRNA	Messenger ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
T	Thymin
TGF	Transforming growth factor
Taq	Thermus aquaticus
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Units

### **6.3 Abbildungsverzeichnis**

**Abb. 1:** Immunologische Funktionen intestinaler Epithelzellen.

**Abb. 2:** Zusammenspiel der Faktoren bei der Pathogenese der CED.

**Abb. 3:** Die Chemokinrezeptoren und ihre Liganden.

**Abb. 4:** Kombination der Polymorphismen am Codon 249 und 280 bei M. Crohn-Patienten.

**Abb. 5:** Beispiel einer Gelelektrophorese der Restriktionsverdauprodukte.

**Abb. 6:** Die kombinierten Genotypen beim Verdau mit Acl I und HpyCH4 III.

**Abb. 7:** Gegenüberstellung der kombinierten Polymorphismen am Codon 249 und 280 bei M. Crohn-Patienten und Kontrollkollektiv.

**Abb. 8:** Hypothese zum Einfluss von T280M-CX3CR1-Polymorphismen auf den M. Crohn-Krankheitsphänotyp.

## **6.4 Tabellenverzeichnis**

- Tab. 1:** Mit Colitis ulcerosa und M. Crohn assoziierte genetische Risikomarker.
- Tab. 2:** Zusammenfassung weiterer Suszeptibilitätsgene bei Morbus Crohn.
- Tab. 3:** Gegenüberstellung von Klinik und Pathologie bei M. Crohn und Colitis ulcerosa.
- Tab. 4:** Extraintestinale Manifestationen bei chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen.
- Tab. 5:** Diagnostische Möglichkeiten bei M. Crohn.
- Tab. 6:** Therapieoptionen bei M. Crohn.
- Tab. 7:** Neue Gliederung von Chemokinen, je nach Auftreten bei Mensch und Maus.
- Tab. 8:** Die Verteilung demographischer Daten innerhalb des Patienten- und Vergleichskollektivs.
- Tab. 9:** Sequenz der Primer einer CX3CR1-PCR.
- Tab. 10:** PCR-Bedingungen für CX3CR1.
- Tab. 11:** Aminosäurenaustausch durch CX3CR1-Polymorphismen.
- Tab. 12:** Die verschiedenen *SNP* und der Wildtyp (VV/TT) von CX3CR1.
- Tab. 13:** Vienna-Klassifikation des M. Crohn.
- Tab. 14:** Häufigkeiten der Phänotypen innerhalb des M. Crohn-Studienkollektivs gemäß der 24 Untergruppen der Vienna-Klassifikation.



**Tab. 15:** Vergleich der Verteilung der einzelnen CX3CR1-Polymorphismen zwischen M. Crohn-Patienten (MC) und dem Kontrollkollektiv.

**Tab. 16:** Assoziation des V249I-Polymorphismus mit M. Crohn-Merkmalen.

**Tab. 17:** Assoziation des T280M-Polymorphismus mit M. Crohn-Merkmalen.

**Tab. 18:** Zusammenfassung der überarbeiteten „Montreal-Klassifikation“ des M. Crohn.

## **6.5 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. H. Diepolder gilt mein besonderer Dank für die Ermöglichung der Arbeit.

Herr PD Dr. med. S. Brand hat mir dieses Thema überlassen. Ich möchte mich oftmals für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit sowie die inhaltliche Hilfe und die fachliche Kompetenz bedanken. Durch seine ständige Gesprächsbereitschaft und Motivation bin ich stets unterstützt worden.

Herrn PD Dr. med. T. Ochsenkühn und der ganzen CED-Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die Überlassung des Patientenkollektivs und die Zusammenarbeit beim Erstellen der Krankheits-Phänotyp-Datei.

Beim Laborteam der Molekularbiologie des Instituts für Klinische Chemie am Klinikum der Universität München/Großhadern möchte ich mich besonders bedanken. Vor allem Herr Prof. Dr. med. P. Lohse, Frau Pia Lohse, Frau Heike Rübsamen und Frau Dr. A. Fuchs haben mir das technische „Know-How“ für die Methoden vermittelt und mich jederzeit unterstützt.

Herrn Crispin danke ich für die Hilfe bei der Statistik.

Simone Pfennig war ebenfalls eine große Hilfe bei der statistischen Auswertung und der Literatursuche. Ich bedanke mich sehr für die Hilfe bei jeglicher Problembewältigung.

Bei meinen Mitdoktoranden Tanja Staudinger, Fabian Schnitzler und Julia Diegelmann möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die gegenseitige Motivation bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht und mich immer wieder ermutigt hat.

## **6.6 Lebenslauf**

### **Katrin Hofbauer**

Geburtsdatum/-ort      15.01.1978 in Trostberg /Deutschland

Familienstand            ledig

Konfession                römisch-katholisch

### **Schullaufbahn**

---

1984-1988                Grundschule Altenmarkt /Alz

1988-1997                Gymnasium Gars /Inn  
Abitur 1997

### **Beruf**

---

01.01.–31.12.1998      Krankenpflegehelferin (staatl. geprüft)  
Bezirkskrankenhaus Gabersee

01.10.2006-31.09.2007    Assistenzärztin in der Unfallchirurgie am Spital  
Waldshut

01.10.2007-31.12.2007    Assistenzärztin in der HNO am Kantonsspital  
Aarau (CH)

Seit 01.04.2008          Assistenzärztin in der HNO-Gemeinschaftspraxis  
Dres. Heiden/Biesinger/Höing in Traunstein

### **Studium**

---

05/1999 – 06/2006      Medizinstudium an der LMU München

08/2001                  Physikum

08/2002                  1. Staatsexamen

08/2004                  2. Staatsexamen

06/2006                  3. Staatsexamen

**Praktisches Jahr**

---

Innere Medizin	Krankenhaus München – Neuperlach (4 Monate)
HNO	Universitätsspital Basel/Schweiz (4 Monate)
Chirurgie	Krankenhaus München – Harlaching (4 Monate)

**Famulaturen**

---

HNO	Poliklinik der LMU München/Innenstadt (2002)
Arbeitsmedizin sowie Notfallambulanz	Medizinischer Dienst des Flughafens München (2002)
Anästhesie	Krankenhaus der Barmherzigen Brüder/München (2003)
Innere Medizin	Krankenanstalt Rudolfstiftung Wien/Österreich (2004)

**Praktische Erfahrung**

---

01.01. – 08.02.1999	Krankenpflegehelferin an der Neurologischen Klinik Bad Aibling
1998/1999	Ausbildung zum Rettungsdiensthelfer bei der Johanniter-Unfall-Hilfe Wasserburg/Inn
2001 - 2006	Studentische Aushilfe an der Abteilung für geriatrische Rehabilitation Krankenhaus der Barmherzigen Brüder /München

**Veröffentlichungen**

---

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.

\*geteilte Erstautorenschaft

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 Jul;11(7):645-52.

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 Apr;58(2-3):99-106.

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 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. *Scand J Gastroenterol*. 2006 Dec;41(12):1421-32.

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.

### Abstracts und Poster

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. 59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, September 1-4, 2004, Leipzig, Germany.

*Z Gastroenterol* 2004;42:833.

Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, **Hofbauer K**, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Hölzel D, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. The role of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms in Crohn's disease.

12<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Prague, Czech Republic, September 25-29, 2004

*Gut* 2004; 53 (Suppl. VI):A146.

Brand S, **Hofbauer K**, Dambacher J, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Seiderer J, Tillack C, Konrad 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.

Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA.

*Gastroenterology* 2005;128 (4; Suppl. 2): A650.

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 Susceptibility and Phenotype of Crohn's Disease. Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. *Gastroenterology* 2005;128 (4; Suppl. 2): A440.

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. Presidential Poster, World Congress of Gastroenterology, Montreal, Canada, September 12-14, 2005. *Can J Gastroenterol* 2005;19 (Suppl. B): 6B.

### **Preise**

Presidential Poster Prize, World Congress of Gastroenterology 2005, Montreal, Canada