

Medizinische Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Aus der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. W. T. Knoefel

**Die Bedeutung des Interleukin–1-Systems
für den Knochenmasseverlust bei Patienten
mit chronisch entzündlichen Darmkrankheiten**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Lars Bansemir

2007

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. K. Schulte

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Winter

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Patienten, Material und Methoden</u>	6
2.1 <u>Patienten</u>	6
2.1.1 Patientenpopulation	6
2.1.2 Kontrollgruppe	7
2.2 <u>Knochendichte</u>	7
2.2.1 Knochenmineraldichtemessung	8
2.2.2 Analyse des Knochenmasseverlustes	9
2.3 <u>Genetische Analytik</u>	10
2.3.1 Präparation der genomischen DNA	10
2.3.2 <u>Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des IL-1β</u>	12
(-511) Gens	
2.3.2.a PCR-Ansatz für IL-1 β (-511)	12
2.3.2.b Amplifikationsbedingungen für IL-1 β (-511)	13
2.3.2.c Verdau des IL-1 β (-511) Fragmentes	14
2.3.2.d Gelelektrophoretische Auftrennung des Produktes des Restriktionsverdaus -Elektrophoresegerät; Herstellung der Agarosegele; Verdünnung des Laufpuffers; Laufbedingungen; Standard; Photodokumentation	15
2.3.3 <u>Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des IL-1β</u>	17
Gens (+3954)	
2.3.3.a PCR-Ansatz für IL-1 β (+3954)	17
2.3.3.b Amplifikationsbedingungen für IL-1 β (+3954)	18
2.3.3.c Verdau des IL-1 β (+3954) Fragmentes	19
2.3.3.d Gelelektrophoretische Auftrennung des Produktes des Restriktionsverdaus -Elektrophoresegerät; Herstellung der Agarosegele; Verdünnung des Laufpuffers; Laufbedingungen; Standard; Photodokumentation	20

2.3.4	Allelotypisierung des IL-1ra Gens	22
2.4	Statistische Auswertung	23
3.	<u>Ergebnisse</u>	24
3.1	Charakteristika der Patientenpopulation	24
3.2	Ausgangsknochenmasse und Knochenmasseveränderung bis zur Verlaufskontrolle	24
3.3	Ergebnisse der genetischen Analytik	25
3.3.1	Verteilung der IL-1 β Polymorphismen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	25
3.3.2	Assoziation der IL-1 β Polymorphismen mit der Erkrankungsaktivität und der Ausgangsknochenmasse	26
3.3.3	Assoziation zwischen den IL-1 β und IL-1ra Polymorphismen und der Aktivität der Erkrankung bis zur Verlaufskontrolle	27
3.3.4	Assoziation der IL-1 Polymorphismen mit der prospektiv beobachteten Knochenmasseveränderung	27
3.3.5	Das genetische protektive IL-1ra und IL-1 β Profil bei CED	28
4.	<u>Diskussion</u>	29
5.	<u>Zusammenfassung</u>	33
6.	<u>Glossar</u>	35
7.	<u>Literatur</u>	41
8.	<u>Anhang</u>	45
9.	<u>Lebenslauf</u>	56
10.	<u>Danksagung</u>	58

1. Einleitung

Osteoporose wird durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Krankheit definiert, die durch Verlust an Knochenmasse und Zerstörung der Mikroarchitektur des Knochens mit der Folge eines ansteigenden Frakturrisikos charakterisiert ist. Gemäß den WHO-Kriterien für die Diagnose der Osteoporose, die auf Knochendichtemessungen mittels Dual-Energy-X-Ray-Absorptiometrie basieren, wird ein Knochenmasseverlust, der größer oder gleich 2.5 Standardabweichungen im Verhältnis zu der mittleren Knochendichte junger, geschlechtsgemachter Kontrollen beträgt, als Osteoporose definiert. Spätkomplikationen wie osteoporotisch bedingte Frakturen oder ein Schmerzsyndrom verursachen eine signifikante Minderung der Lebensqualität und sind für hohe Kosten im Gesundheitswesen verantwortlich (1: Ray 1997). Die Klassifikation der Osteoporose umfasst die primären Osteoporosen, zu denen die senilen, die postmenopausalen und die idiopathischen Osteoporosen zählen, und die sekundären Osteoporosen. Unter den sekundären Osteoporosen werden alle Osteoporosen zusammengefasst, bei denen ein kausaler Faktor oder eine ursächliche Erkrankung zu identifizieren ist (2: Lindsay 1992). Eine Vielzahl von Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes wie die chronisch entzündlichen Darmkrankheiten (CED), die glutensensitive Enteropathie oder der Zustand nach Gastrektomie können mit einer sekundären Osteoporose bei jungen Patienten assoziiert sein(3: Bernstein 2003).

Die Prävalenz der **chronischen entzündlichen Darmkrankheiten (CED)** ist innerhalb der letzten Jahrzehnte in den westlichen Staaten angestiegen, wobei

meistens junge Patienten zwischen 15 und 35 Jahren betroffen sind (4: Duchmann 1999). Zu diesen zählt man die Colitis ulcerosa und den Morbus Crohn, welche beide Immunerkrankungen mit chronischen, wiederkehrenden Entzündungen darstellen (5: Sartor 1997). Obwohl die genaue Ursache der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten noch nicht geklärt ist (6: Fiocchi 1998), trägt das Zusammenspiel verschiedener Zytokine mit immunregulatorischer und proinflammatorischer Wirkung, wie Interleukin-1 (7: Cominelli 1996) und Interleukin-6 (8: Papanicolaou 1998) sowie der anti-inflammatorische Interleukin-1 Rezeptorantagonist zur Pathogenese der anhaltenden Entzündung bei. Eine der Herausforderungen ist es nun, diejenigen Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Osteoporose haben, bevor sie signifikant an Knochenmasse verloren oder eine Fraktur erlitten haben. Eine Risikoabschätzung könnte auch eine Genotypanalyse beinhalten.

Je niedriger die maximale Knochenmasse („peak bone mass“) ist, die meistens zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr erreicht wird (9: Christiansen 1987) und je höher der Knochenmasseverlust, desto größer ist auch das Risiko einer Osteoporose. Es gibt deutliche Hinweise, dass genetische Faktoren die „peak bone mass“, das Ausmaß des Knochenmasseverlustes und damit letztlich das Frakturrisiko mit determinieren (10: Peacock 2002) (11: Ralston 2003) (12: Xiong 2003) (13: Zajickova 2003) (14: Liu Y-Z 2003). Eine Vielzahl von Genen ist in Bezug auf eine Assoziation zwischen Knochendichte und osteoporotisch bedingten Frakturen getestet worden (15: Uitterlinden 1998) (16: Stykarsdottir 2003).

Genetische Variationen von **Zytokinen**, die eine Schlüsselposition in der Regulation des Entzündungsprozesses einnehmen, sind bei dem CED-assoziierten

Knochenmasseverlust und der Osteoporose von besonderer Bedeutung. Es ist wiederholt postuliert worden, dass der Knochen als metabolisches Kompartiment auf Stress reagiert, so auch auf den Stress, der durch Entzündungsprozesse hervorgerufen wird (17: Minne 1984). Als molekulare Basis für den Zusammenhang zwischen systemischer Entzündung und Osteoporose wird das OPG-RANK-RANKL-System angesehen. Das Verhältnis zwischen dem zellständigen Rezeptor des Aktivators des Liganden des nukleären Faktor kappa B (RANK-L) und dem löslichen Rezeptor Osteoprotegerin determiniert die Regulation der osteoklastär vermittelten Knochenresorption (18: Kong, 2002).

Die Arbeitsgruppe um Schulte konnte erstmals eine genetische Determination des CED-assoziierten Knochenmasseverlustes zeigen. Träger der 130 bp Allele des Interleukin-6 (IL-6) Gens, die jedoch kein 240 bp Allel des Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1-ra) trugen, litten unter einem signifikant erhöhten Knochenmasseverlust (19: Schulte 2000).

Der **Interleukin-1-Cluster** auf dem langen Arm des Chromosoms 2 kodiert auf einer 430 kb großen Region für die drei Proteine IL-1 alpha, IL-1 beta und IL-1ra (20: Nicklin 1994). Dieser Genkomplex besitzt eine Vielzahl von funktionell relevanten Polymorphismen, die die IL-1 β und IL-1ra Produktion beeinflussen (21: Hwang 2002) (22: Danis 1995). Die Schwere der Erkrankung und der Zeitpunkt der klinischen Manifestation einiger chronischer Entzündungs- und Autoimmunerkrankungen, wie der Multiplen Sklerose (23: Schrijver 1999), des systemischen Lupus erythematodes (24: Blakemore 1994) und auch der Colitis ulcerosa (25: Mansfield 1994) sind teilweise durch IL-1 β und IL-1ra Gene bestimmt. Eine veränderte Produktion und eine veränderte mukosale Konzentration des IL-1 β und des IL-1ra scheinen pathogenetische Faktoren der CED zu sein, wobei das Verhältnis zwischen IL-1ra und IL-1 β die engste

Korrelation zum Entzündungsprozess zeigt (26: Casini-Raggi 1995) (27: Dinarello 1996). Neben der pro-inflammatorischen Aktivität besitzt Interleukin-1 (IL-1) auch eine Knochen abbauende Wirkung. Der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1-ra) antagonisiert die Effekte des IL-1 als natürlicher Gegenspieler, indem er am IL-1-Rezeptor bindet und die biologische Aktivität des IL-1 alpha und beta neutralisiert.

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob verschiedene Polymorphismen des Interleukin-1-Gens mit dem prospektiv beobachteten Knochenmasseverlust assoziiert sind. Wir benutzten zwei biallelische Basenaustauschpolymorphismen als Marker-Allele für IL-1 β , zum einen an Position -511 in der Promotorregion (28: Giovini 1992), zum anderen an Position +3954 im fünften Exon (29: Pociot 1992) in Bezug auf die Transkriptions-Startstelle. Der IL-1 β -511 Polymorphismus ist mit keiner erhöhten IL-1 β in vitro Produktion assoziiert (30: Santtila 1998). Zur funktionellen Bedeutung des IL-1 β +3954 Polymorphismus ist die Datenlage nicht eindeutig. Pociot beschreibt 1992 eine signifikante Assoziation zwischen dem Polymorphismus und der IL-1 β in vitro Produktion, die aber 1998 von Santtila nicht bestätigt werden konnte.

Das Vorhandensein dieser Polymorphismen wurde nun mit Knochenmasse zu Beginn der Studie und dem Knochenmasseverlust in einem prospektiv beobachteten Zeitraum von 22.6 ± 6.5 Monaten korreliert. Patienten, die älter als 50 Jahre alt waren, schlossen wir aus der Studie aus, um so die Fehlerquelle des alters- und menopausalbedingten Knochenmasseverlustes zu reduzieren und so hauptsächlich die CED-assoziierte Knochenmasseveränderung zu messen. Neben der alleinigen Analyse der IL-1 β Polymorphismen fragten wir nach der Bedeutung der Kombination der verschiedenen IL-1 β und IL-1ra

Polymorphismen auf den Knochenmasseverlust, um somit weitere genetische Determinanten des CED-assoziierten Knochenmasseverlustes zu identifizieren. Letztendlich soll mit Hilfe dieser genetischen Determinanten das Risiko für das Auftreten einer Osteoporose bei Patienten mit CED bestimmt werden, um dann Hochrisiko-Patienten präventiv und effektiv behandeln zu können.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenpopulation

Die Diagnose der CED wurde auf der Basis klinischer, radiologischer, endoskopischer und pathologischer Kriterien gestellt. Ausschlusskriterien waren eine CED vom Indifferenz-Typ, unklare Subtypen oder zweifelhafte Diagnosen, frühere Organtransplantationen, andere systemische Entzündungskrankheiten, die Einnahme von knochentoxischen Substanzen (außer Steroiden) wie Heparin, Thyroxin, Cyclosporin A, der Gebrauch osteoanaboler oder antiresorptiver Substanzen wie Bisphosphonate, Fluoriden, aktiven Vitamin D- Metaboliten oder Parathormon, spezifische Knochenerkrankungen und andere endokrinologische, metabolische und nutrionale Erkrankungen. Außerdem schlossen wir alle Patienten, die älter als 50 Jahre waren, von der Studie aus. Patienten, bei denen im weiteren Verlauf bis zum Zeitpunkt der Verlaufskontrolle eine Therapie mit einem knochenstoffwechselaktiven Medikament begonnen wurde, wurden ausgeschlossen.

Die Studie wurde gemäß der Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt; alle Patienten gaben eine Einverständniserklärung ab, bevor sie an der Studie teilnahmen. Insgesamt wurden 109 konsekutive CED-Patienten (77 Morbus Crohn, 32 Colitis ulcerosa) in die Studie aufgenommen. Die Hauptmerkmale der Studienpopulation sind in der Tabelle 2.1-1 zusammengestellt. Alle Untersuchungen wurden entweder während regelmäßiger ambulanter Untersuchungen oder während eines stationären Aufenthalts gemacht. Zum Studienbeginn wurden von Frau PD Dr. Schulte alle Patienten mittels eines standardisierten Fragebogens interviewt (siehe Abbildung 2), um den

klinischen Verlauf und die Therapie der Erkrankung, mögliche Begleiterkrankungen und deren Therapie sowie den Lebensstil, wie etwa die Rauch- und Trinkgewohnheiten, zu evaluieren. Die kumulative Steroiddosis am Studienbeginn (umgerechnet in ein Prednisolonäquivalent) wurde mit Hilfe von Patienteninformationen und den Krankenakten von Frau PD Dr. Schulte errechnet. Die Steroiddosis wurde zum einen als Gesamtdosis (total g) und zum anderen als Tagesdosis (mg/Tag) dargestellt.

Die Aktivität der Erkrankung, ihre Dauer und die Anzahl akuter Schübe, die eine akute Steroidtherapie und/oder einen Krankenhausaufenthalt nötig machten, wurden ebenso bestimmt wie das Muster und die Lokalisation der intestinalen Entzündung und die Anzahl der chirurgischen Interventionen. Die Lokalisation und das Muster des Morbus Crohn wurden gemäß der Wiener Klassifikation eingeordnet (Definition siehe in der Legende der Tabelle 2.1-1 und (30: Gasche 1998)). Die Patienten wurden $22,6 \pm 6,5$ Monate (zwischen 14,4 und 44 Monaten, Median 20 Monate) nach der Erstuntersuchung erneut untersucht. Wiederum wurde die zwischen der Erstuntersuchung und der erneuten Untersuchung applizierte Steroiddosis mit Hilfe eines standardisierten Fragebogens (siehe Abbildung 3) und den Krankenakten errechnet. Diese Dosis wurde ebenfalls als Prednisolonäquivalent in mg/Tag dargestellt.

2.1.2 Kontrollpopulation

Als Kontrollgruppe für die Analyse der Verteilung der Polymorphismen in der Normalbevölkerung dienten 100 erwachsene Patienten, die wegen Polytraumen konsekutiv im Unfallkrankenhaus Berlin (UKB) aufgenommen worden sind. Der initiale Verletzungsindex (ISS) betrug $37,3 \pm 12,5$, das Durchschnittsalter $34,1 \pm$

16.7 Jahre. Es bestand jeweils ein niedriger präklinischer Erkrankungs hintergrund. Für eine detaillierte Beschreibung der Kontrollpopulation siehe (31: Laun 2003).

2.2 Knochendichte

2.2.1 Knochenmineraldichtemessung

Die Knochendichte wurde mittels Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA) (Lunar DPX-L, Madison, Wisconsin, USA) an der Lendenwirbelsäule (durchschnittliche Knochendichte des zweiten, dritten und vierten Wirbels) und am proximalen Femur (Femurhals, Trochanter und Ward's Dreieck) bestimmt. Alle Messungen wurden an einem DEXA-Gerät durchgeführt. Alle Analysen wurden von zwei Untersuchern durchgeführt, um die Interobserver-Variabilität möglichst klein zu halten. Sämtliche Auswertungen der Untersuchung wurden von einem Untersucher vorgenommen.

Die Ergebnisse der Knochendichte wurden konventionsgemäß zum einen als Zahl der Standardabweichungen vom Normalwert einer jungen gesunden geschlechtsgemachten Kontrollgruppe (T-Score) und zum anderen als Zahl der Standardabweichungen vom Normalwert einer alters- und geschlechtsgemachten Kontrollgruppe (Z-Score) dargestellt (33: Kanis JA 2000). Die Normalwerte der Kontrollgruppe wurden von Lunar Cooperation (Madison, Wisconsin, USA) bereitgestellt. Diese Werte beruhen auf den Messpunkten einer Gruppe von 2588 weißen Frauen und Männern im Alter zwischen 20-79 Jahren in Europa und den USA. Gemäß der WHO-Definition wird eine normale Knochendichte als T-Score > -1 SD, eine Osteopenie als T-Score ≤ -1 und > -2.5 SD und eine Osteoporose als T-Score ≤ -2.5 SD definiert. Um der weiten

Altersspanne der Studienpopulation Rechnung zu tragen, benutzten wir den Z-Score. Zur internen Qualitätssicherung wurde täglich die Knochendichte eines Standardblocks aus gewebe-äquivalentem Material, bestehend aus drei Knochen simulierenden Kammern, deren Knochenmineralgehalt bekannt war, bestimmt. Die Abweichung der Knochendichte zwischen den täglich durchgeführten internen Qualitätskontrollen durfte 3% nicht überschreiten. Zusätzlich wurde monatlich mit einem anthropomorphen Wirbelphantom kontrolliert.

Die Körperzusammensetzung wurde ebenfalls mittels Dual Energy X-Ray Absorptiometrie (DEXA) (Lunar DPX-L, Madison, Wisconsin, USA) als Ganzkörperscan mit den Körperkompartimenten der Fettmasse, der Weichteilmasse (bestehend aus Muskelmasse, Flüssigkeiten und Bindegewebe, etc) und dem mineralischen Knochen ermittelt. Die Ergebnisse wurden in kg Fettmasse, kg Weichteilgewebe (\approx Muskelmasse) und Gesamtkörpergewicht (Fettmasse + Weichteilmasse + Knochenmineralgehalt) dargestellt.

2.2.2 Analyse des Knochenmasseverlustes

Der Knochenmasseverlust wurde aus dem Unterschied zwischen Erst- und Wiederuntersuchung der Knochendichte kalkuliert und wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Ausgangswert} - \text{Wert der Zweituntersuchung}}{\text{Ausgangswert}}$$

Um die Zeitintervalle anzugleichen, wurden alle Daten auf die Veränderung der Knochendichte pro Jahr bezogen.

2.3 Genetische Analytik

2.3.1 Präparation der genomischen DNA:

Die DNA wurde aus 200 µl venösem EDTA-Blut mittels eines kommerziellen Kits (QIAamp DNA Extraktions Kit; Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert, wobei ca. 1 µg DNA gewonnen wurde. Die DNA-Qualität und Quantität wurde durch Spektrophotometrie bei 260/280 nm und durch Agarosegelelektrophorese mit Zugabe von 1 µg/ml Ethidiumbromid überprüft und ihre Eignung für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Benutzung in verschiedenen Amplifikationssystemen kontrolliert. Die DNA wurde von 109 Patienten mit CED und von der Kontrollgruppe (n=100) isoliert und analysiert.

Schematische Darstellung des DNA-Isolationsvorgangs:

1. Pipettieren von je 200 µl Blutprobe in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße.
2. Hinzufügen von 20 µl Protease (QIAGEN).
3. Hinzufügen von 200 µl Lyse-Puffer (Buffer AL, QIAGEN), sofortiges Mischen durch Vortexgerät (Typ VF2, Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG) für 15 Sekunden.
4. Bei 56°C für 10 Minuten im Thermomixer (Typ 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg) inkubieren.
5. Hinzufügen von 200 µl Ethanol 100% (Fa. Merck, Darmstadt), mischen durch Vortexgerät für 15 Sekunden.
6. Überführen der Mischung in eine „QIAamp Spin column“, die in eine „2-ml collection tube“ gesteckt wurde.
7. Zentrifugieren bei 6000 x g für 1 Minute (Eppendorf Centrifuge 5403).
8. „QIAamp spin column“ in eine saubere „2-ml collection tube“ stecken, anschließend Verwerfen der „collection tube“ mit dem Filtrat.

9. In die „QIAmp spin column“ 500 µl Waschpuffer 1 (Buffer AW1, QIAGEN) pipettieren.
10. Zentrifugieren bei 6000 x g für 1 Minute.
11. „QIAmp spin column“ in eine saubere „2-ml collection tube“ stecken, anschließend Verwerfen der „collection tube“ mit dem Filtrat.
12. Pipettieren von 500 µl Waschpuffer 2 (Buffer AW2, QIAGEN) in die „QIAmp spin column“.
13. Zentrifugieren bei 20000 x g für 3 Minuten.
14. „QIAmp spin column“ in ein sauberes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß stecken, Verwerfen der „collection tube“ mit dem Filtrat.
15. Pipettieren von 200 µl Elutionspuffer (Buffer AE, QIAGEN) in die „QIAmp spin column“.
16. Zentrifugieren bei 6000 x g für 1 Minute.

2.3.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des IL-1 β (-511) Gens

Die oligonukleotiden Primer für die Amplifikation der IL-1 β Genfragmente stammten von publizierten Genomsequenzen. Der IL-1 β Promotor ist Bestandteil der Gensequenz X04500. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich bei 1934 in X04500. Die Numerierung wurde im Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt festgelegt (minus ~ stromaufwärts; plus ~ stromabwärts). Die Position -511 im Bereich der Promotorregion, korrespondierend zu 1423 im X04500, weist einen C/T Polymorphismus auf.

Primer	Sequenz	Amplimer	Bindungsstelle
IL-1 β (-511)F	5`TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC	304 bp	1232-1251
IL-1 β (-511)R	5`GTT TAG GAA TCT TCC CAC TA		1536-1517

Legende:

Angegeben sind die Oligonukleotidprimer mit der Sequenz des Vorwärts- und Rückwärtsstranges (5`-3`), die erwartete Amplimerlänge und die jeweiligen Bindungsstellen.

2.3.2.a PCR-Ansatz für die Bestimmung des IL-1 β (-511) Polymorphismus

Taq-Master-Mix	(Qiagen, Hilden)	4,0 μ l
Vorwärtsprimer IL-1 β (-511) F	[5 pmol/ μ l]	0,5 μ l
Rückwärtsprimer IL-1 β (-511) R	[5 pmol/ μ l]	0,5 μ l
Wasser, PCR-rein	(Qiagen, Hilden)	1,5 μ l
DNA	(50 μ g/ μ l)	1,5 μ l
Σ		8,0 μ l

2.3.2.b Amplifikationsbedingungen für die Bestimmung des IL-1 β (-511) Polymorphismus

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Inkubation	94°C	5 min.	1
Denaturierung	94°C	30 sek.	36
Annealing	72°C	30 sek.	
Extension	72°C	1 min.	
Endinkubation	72°C	10 min.	1

Legende:

Für die Polymerasekettenreaktion wurde ein Gerät der Firma Biometra, Göttingen, vom Typ Thermocycler Whatman Biometra T Gradient benutzt. Die Reaktions-Mischungen wurden auf 96-well-Mikrotiterplatten (Whatman Biometra Göttingen) aufgetragen und mit einer Silikonabdeckung (Nr. 050-237, Fa. Whatman Biometra, Göttingen) versiegelt. Die Amplifikationsbedingungen für die beiden Oligonukleotid-Primer sind in der Tabelle angegeben.

2.3.2.c Verdau des IL-1 β (-511) Fragmentes

Das amplifizierte IL-1 β (-511) Fragment enthält einen C/T Polymorphismus an Position 1423, welcher eine Eco881 (~AvaI) Restriktionsstelle erzeugt. Für die Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des IL-1 β (-511) Gens wurden die Amplimere durch die Restriktionsendonuklease Eco881 (Fermentas, Germany, Katalognummer: ER0381) verdaut. Wenn die Eco881-Stelle vorhanden war, erzeugte der Restriktionsverdau zwei Fragmente mit einer Länge von 189 und 115 bp.

Schematische Darstellung des Verdaus:

1. Zu jeder Amplimerprobe (je 8 μ l) wurde eine Mischung aus folgenden Bestandteilen gegeben:

10x one phor all buffer	(Boehringer, Mannheim, Germany)	2,4 μ l
Eco881 (10 U/ μ l)	(Fermentas, St. Leon-Roth, Germany)	0,1 μ l
nukleasefreies Wasser	(Promega, Madison , WI, USA)	13,5 μ l
Σ		16,0 μ l

2. Auftragen der Reaktionsmischungen auf 96-well-Mikrotiterplatten (Whatman, Biometra, Göttingen, Germany) und Versiegelung mit einer Silikonabdeckung (Nr. 050-237, Fa. Whatman Biometra, Göttingen).

3. Inkubation in einem Memmert-Brutschrank bei 37°C für 24 Stunden.

2.3.2.d Gelelektrophoretische Auftrennung des Produktes des

Restriktionsverdaus

Die durch den Restriktionsverdaus erzeugten Fragmente wurden durch eine Gelelektrophorese auf 1,0% wt/vol Agarosegel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) nachgewiesen und mit einem Molekulargewichtstandard 1kb plus (GIBCO) verglichen.

Elektrophoresegerät

Stromquelle:	Power Pack 300 (Fa. Bio-Rad, USA)
Pufferkammer:	Sub-Cell-GT Wide Mini (Fa. Bio-Rad, USA)
Gelwanne:	Sub-Cell-GT Wide Mini (Fa. Bio-Rad, USA)
Kamm:	Sub-Cell-GT Wide Mini, 20 Zähne (Fa. Bio-Rad, USA)

Herstellung der 1,0 % Agarosegele

Aus 250 ml Tris-Borate-EDTA-Buffer (TBE-Buffer) 5x Konzentrat (Fa. Sigma, Steinheim) und 250 ml Aqua dest. wurde eine 2,5x konzentrierte TBE-Pufferlösung hergestellt. 100 ml dieser Lösung wurden in einem Erlenmeyerkolben mit 1,0 g GIBCO BRL ultra Pure Agarose Electrophoresis Grade, 15510-027 (Fa. Life Technologies, Paisley, Scotland) gemischt und in einer Mikrowelle 4 min. bei 800 W erhitzt. Anschließend wurden 1,0 µl Ethidiumbromid hinzugesetzt und gründlich vermischt. Diese Mischung wurde in die mit zwei Kämmen bestückte Gelwanne gegossen. Nach 20 Minuten wurde die Gelwanne in die mit Laufpuffer gefüllte Pufferkammer eingesetzt und die Kämmen konnten gezogen werden.

Verdünnung des Laufpuffers

Aus 200 ml Tris-Borate-EDTA-Buffer (TBE-Buffer) 5x Konzentrat (Fa. Sigma, Steinheim) und 800 ml Aqua dest. wurde eine 1x konzentrierte TBE-Pufferlösung hergestellt. Die Pufferkammer wurde bis 1 cm unter der „max.“-Markierung mit dieser Lösung gefüllt.

Laufbedingungen

Die Laufzeit wurde für die mit Eco881 verdauten IL-1 β (-511) PCR-Produkte auf 45 Minuten bei 110 V und 0,4 A festgelegt.

Standard

Eine Geltasche jeder Agarosegelplatte wurde mit einem Molekulargewichtstandard (1kb-plus, Fa. GIBCO) beladen. Hierfür wurden 5 μ l Standard vor dem Auftragen mit 3 μ l Gel Loading Solution, G-2526 (Fa. Sigma, Steinheim) gemischt.

Fotodokumentation

Die fotografische Darstellung der Banden auf dem Agarosegel erfolgte unter UV-Licht (Gerät: Crosslinker Typ CL 1, Fa. Biometra, Göttingen) mit einem MP4+ Instant Camera System (Fa. Bachofer, Reutlingen) mit einer Blendeneinstellung von 4,5 und einer Belichtungszeit von 1 Sekunde. Als Film wurde ein Polaroid Instant Pack Film 8,5 x 10,8 cm T 667 (Fa. Polaroid U.K. Ltd., Wheathhampstead, England) benutzt.

2.3.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des IL-1 β (+3954)

Gens

Die oligonukleotiden Primer für die Amplifikation der IL-1 β Genfragmente stammten von publizierten Genomsequenzen. Der IL-1 β Promotor ist Bestandteil der Gensequenz X04500. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich bei 1934 im X04500. Die Nummerierung wurde im Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt festgelegt (minus ~ stromaufwärts; plus ~ stromabwärts). Die Position +3954 im Bereich des 5. Exons, korrespondierend zu 5887 im X04500, besitzt einen C/T Polymorphismus.

Primer	Sequenz	Amplimer	Bindungsstelle
IL-1 β (+3954)F	5`GTT GTC ATC AGA CTT TGA CC	250 bp	5751-5770
IL-1 β (+3954)R	5`TTC AGT TCA TAT GGA CCA GA		6000-5981

Legende:

Angegeben sind die Oligonukleotidprimer mit der Sequenz des Vorwärts- und Rückwärtsstranges (5`-3`), die erwartete Amplimerlänge und die jeweiligen Bindungsstellen.

2.3.3.a PCR-Ansatz für die Bestimmung des IL-1 β (+3954)

Polymorphismus

Taq-Master-Mix	(Qiagen, Hilden)	4,0 μ l
Vorwärtsprimer IL-1 β (+3954) F	[5 pmol/ μ l]	0,5 μ l
Rückwärtsprimer IL-1 β (+3954) R	[5 pmol/ μ l]	0,5 μ l
Wasser, PCR-grade	(Qiagen, Hilden)	1,5 μ l
DNA	(50 μ g/ μ l)	1,5 μ l
Σ		8,0 μ l

2.3.3.b Amplifikationsbedingungen für die Bestimmung des IL-1 β (+3954) Polymorphismus

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Inkubation	94°C	5 min.	1
Denaturierung	94°C	30 sek.	36
Annealing	72°C	30 sek.	
Extension	72°C	1 min.	
Endinkubation	72°C	10 min.	1

Legende:

Für die Polymerasekettenreaktion wurde ein Gerät der Firma Biometra, Göttingen, vom Typ Thermocycler Whatman Biometra T Gradient benutzt. Die Reaktions-Mischungen wurden auf 96-well-Mikrotiterplatten (Whatman Biometra Göttingen) aufgetragen und mit einer Silikonabdeckung (Nr. 050-237, Fa. Whatman Biometra, Göttingen) versiegelt. Die Amplifikationsbedingungen für die beiden Oligonukleotid-Primer sind in der Tabelle angegeben.

2.3.3.c Verdau des IL-1 β (+3954) Fragmentes

Das amplifizierte IL-1 β (+3954) Fragment enthält einen C/T Polymorphismus an Position 5887, wobei das Vorhandensein der T-Variante eine Taq1 Restriktionsstelle erzeugt. Für die Analyse des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus des IL-1 β (+3954) Gens wurden die Amplimere durch die Restriktionsendonuklease Taq1 (Fermentas, Germany, Katalognummer: ER0672) verdaut. Wenn die Taq1-Stelle vorhanden war, erzeugte der Restriktionsverdau zwei Fragmente mit einer Länge von 136 und 114 bp.

Schematische Darstellung des Verdaus:

1. Zu jeder Amplimerprobe (je 8 μ l) wurde eine Mischung aus folgenden Bestandteilen gegeben:

10x one phor all	(Boehringer, Mannheim, Germany)	2,4 μ l
buffer		
Taq 1 (10 U/ μ l)	(Fermentas, St. Leon-Roth, Germany)	0,1 μ l
nukleasefreies Wasser	(Promega, Madison , WI, USA)	13,5 μ l
Σ		16,0 μ l

2. Auftragen der Reaktionsmischungen auf 96-well-Mikrotiterplatten (Whatman, Biometra, Göttingen, Germany) und Versiegelung mit einer Silikonabdeckung (Nr. 050-237, Fa. Whatman Biometra, Göttingen).

3. Inkubation in einem Memmert-Brutschrank bei 37°C für 4 Stunden.

2.3.3.d Gelelektrophoretische Auftrennung des Produktes des Restriktionsverdau

Elektrophoresegerät

Die Fragmente mit einer Länge von 136 und 114 bp wurden durch eine Gelelektrophorese auf 1,0% wt/vol Agarosegel mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) nachgewiesen und mit einem Molekulargewichtstandard 1kb plus (GIBCO) verglichen.

Stromquelle:	Power Pack 300 (Fa. Bio-Rad, USA)
Pufferkammer:	Sub-Cell-GT Wide Mini (Fa. Bio-Rad, USA)
Gelwanne:	Sub-Cell-GT Wide Mini (Fa. Bio-Rad, USA)
Kamm:	Sub-Cell-GT Wide Mini, 20 Zähne (Fa. Bio-Rad, USA)

Herstellung der 1.0 % Agarosegele

Siehe 2.3.2.d

Verdünnung des Laufpuffers

Siehe 2.3.2.d

Laufbedingungen

Die Laufzeit wurde für die mit Taq I verdauten IL-1 β (+3954) PCR-Produkte auf 45 Minuten bei 110 V und 0,4 A festgelegt.

Standard

Eine Geltasche jeder Agarosegelplatte wurde mit einem Molekulargewichtsstandard (1kb-plus, Fa. GIBCO) beladen. Hierfür wurden 5 µl

Standard vor dem Auftragen mit 3 μ l Gel Loading Solution, G-2526 (Fa. Sigma, Steinheim) gemischt.

Fotodokumentation

Die fotografische Darstellung der Banden auf dem Agarosegel erfolgte unter UV-Licht (Gerät: Crosslinker Typ CL 1, Fa. Biometra, Göttingen) mit einem MP4+ Instant Camera System (Fa. Bachofer, Reutlingen) mit einer Blendeneinstellung von 4,5 und einer Belichtungszeit von 1 Sekunde. Als Film wurde ein Polaroid Instant Pack Film 8,5 x 10,8 cm T 667 (Fa. Polaroid U.K. Ltd., Wheathampstead, England) benutzt.

2.3.4 Allelotypisierung des IL-1ra Gens

Die oligonukleotiden Primer für die Amplifikation des IL-1ra Genfragmentes stammten von publizierten Genomsequenzen. Die Allelotypisierung deckte folgende Amplimere gemäß ihrer variablen Anzahl von Wiederholungssequenzen (tandem repeats) (Schulte et al. 2000) auf:

A1= 410 Basenpaare (bp); A2= 240 bp; A3= 500 bp; A4= 325 bp; A5= 595 bp.

Primer	Sequenz	Genbanknummer	Position
IL-1raF	5`CTC AGC AAC ACT CCT AC	X 64532	8868-8884
IL-1raR	5`TCC TGG TCT GCA GGT AA	X 64532	9279-9263

Legende:

Angegeben sind die Oligonukleotidprimer mit der Sequenz des Vorwärts- und Rückwärtsstranges (5`-3`), die Genbankidentifikationsnummer und die Bindungstellen.

2.4. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Allelfrequenzen wurden durch Division der Anzahl des jeweiligen Allels durch die Anzahl aller Allele berechnet. Die Genotypfrequenz wurde durch Division des TT-Genotyps durch die Anzahl aller Genotypen der untersuchten Studienpopulation berechnet.

Die Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Statistikprogramms JMP (SAS Institute, Cary, N.C., USA) durchgeführt. Unterschiede zwischen den verschiedenen Erkrankungsgruppen und der Kontrollgruppe wurde für normal verteilte Daten mit Hilfe des T-Tests und der Analyse der Varianz (ANOVA) und für nicht normal verteilte Daten mittels des Mann-Whitney U-Tests bestimmt. Die unterschiedliche Allelfrequenz dieser Gruppen wurde durch Chi²-Testung berechnet. Diese Daten wurden für die Anzahl der Fälle, die mittels des Fischer Exact-Tests berechnet worden waren, korrigiert. Eine Signifikanz wurde bei einem P-Wert von < 0.05 angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Patientenpopulation

Die Kohorte bestand aus 109 CED Patienten, mit einem mittleren Alter von 32 Jahren. 77 Patienten waren an Morbus Crohn, 32 an Colitis ulcerosa erkrankt. 60 Patienten waren männlich, 49 waren weiblich. Details zum Krankheitsverlauf seit der Erstdiagnose der Erkrankung sind in der Tabelle 1 zusammengefasst. Die durchschnittliche Knochenmasse war zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Normalbereich. 26% der Patienten litten an Untergewicht ($\text{BMI} < 20 \text{ kg/m}^2$), wobei 30% der Morbus Crohn Patienten, aber nur 15,6% der Colitis ulcerosa Patienten bei Eintritt in die Untersuchung untergewichtig waren (allerdings war der Unterschied nicht signifikant).

Details zum Krankheitsverlauf zwischen Erst- und Wiederuntersuchung ($22,6 \pm 6,5$ Monate nach der Erstuntersuchung) sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Aktivität der Erkrankungen war bis zum Zeitpunkt der Verlaufskontrolle niedrig. 53% der Patienten benötigten in diesem Zeitraum keine immunsuppressive Therapie.

3.2 Ausgangsknochenmasse und Knochenmasseveränderung bis zur Verlaufskontrolle

Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung litten 9% der Patienten an Osteoporose (T-Score $< -2.5 \text{ SD}$) im Bereich der Wirbelsäule, 10 % im Bereich des Femurhalses und 17% im Bereich des Ward's Dreiecks. Die Ausgangsknochenmasse war weder mit dem Alter noch mit der kumulativen Steroidmenge bis zur Erstvorstellung oder der Körperzusammensetzung zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung signifikant assoziiert.

Die durchschnittliche Knochenmasseveränderung war an allen Messpunkten positiv ($+0.69 \text{ SD}$) (siehe auch Tabelle 3). Die Spannbreite der gemessenen

Knochenmasseveränderung war am Femurhals größer als an der Wirbelsäule. Rascher Knochenmasseverlust (definiert als Knochenverlust > 2% pro Jahr) lag bei 15% der Patienten an der Wirbelsäule, bei 26% am Femurhals und bei 30% am Ward Dreieck vor. Die prospektiv beobachtete Knochenmasseveränderung war wiederum weder mit dem Alter noch der Steroidmenge/Tag bis zur Verlaufskontrolle, Ausgangsknochenmasse, Körperzusammensetzung zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung oder der Veränderung der Körperzusammensetzung signifikant assoziiert.

3.3 Restriktionslängen-Polymorphismen

3.3.1 Haplotypverteilung der IL-1 β /IL-1ra Polymorphismen bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten

Die Verteilung der IL-1 β und IL-1ra Genotypen und der korrespondierenden Allelfrequenzen sind in Tabelle 4 dargestellt. Das T-Allel des IL-1 β (+3954) Gens war seltener als das C-Allel, wobei 6.2 % aller CED-Patienten den TT-Haplotyp trugen. Die Allelfrequenz und die Haplotyp-Verteilung des IL-1 β (+3954)-Polymorphismus unterschied sich nicht von unserer Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa zeigte einen nicht signifikanten Trend für eine erhöhte Frequenz des T-Allels bei Morbus Crohn-Patienten. Die Allelfrequenz und die Haplotyp-Verteilung des IL-1 β (-511)-Polymorphismus und des IL-1ra-Polymorphismus unterschieden sich weder zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten noch von unserer Kontrollgruppe. Ebenso wenig bestand eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein der beiden seltener vorkommenden IL-1 β T-Polymorphismen an den Positionen -511 und +3954 und dem IL-1ra 240

Allel. Keine Genotypassoziation war bei den CED-Patienten überrepräsentiert.

3.3.2 Assoziation der IL-1 β / IL-1ra Polymorphismen mit der retrospektiv beobachteten Krankheitsaktivität und der Knochenmasse bis zur Erstuntersuchung

Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, Indices der Körpermasse-Zusammensetzung waren nicht mit dem Vorhandensein spezifischer Polymorphismen assoziiert. Für die verschiedenen Parameter, die die Erkrankungsaktivität beschreiben [Alter bei der Diagnose der Erkrankung, Dauer der Erkrankung, Anzahl der akuten Schübe, Muster und Lokalisation sowie die chirurgischen Interventionen (für den Morbus Crohn gemäß der Wiener Klassifikation (31: Gasche, Schölmerich et al. 2000)) und die Notwendigkeit und Intensität einer immunsuppressiven Therapie], bestand ebenfalls keine Assoziation mit spezifischen Polymorphismen. Dies traf für den Vergleich aller Haplotypen (siehe Tabelle 3.3.-1) zu, mit Ausnahme einer leicht erhöhten Anzahl von akuten Schüben bei Trägern der 240 Allele des IL-1ra im Vergleich zu Nicht-Trägern. Die Einnahme von Steroiden pro Erkrankungstag war für alle spezifischen Haplotypen vergleichbar.

Die Polymorphismen des IL-1 β Gens hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Knochenmasse. Träger des 240 Allels des IL-1ra Polymorphismus zeigten eine leicht verringerte Knochenmasse im Bereich des Femurhalses im Vergleich zu Nicht-Trägern.

3.3.3 Assoziation zwischen den IL-1 β und IL-1ra Polymorphismen und der prospektiv beobachteten Krankheits-Aktivität

Die Veränderung der Körperzusammensetzung, die Art und die Anzahl von chirurgischen Interventionen und die Art und die Menge von immunsuppressiven Medikamenten dienten als Surrogatparameter für die prospektiv beobachtete Erkrankungsaktivität. Es bestand keine Assoziation zwischen den Polymorphismen der IL-1 β und IL-1ra Gene und einem dieser Parameter.

3.3.4 Assoziation der IL-1 Polymorphismen mit der prospektiv beobachteten Knochenmasseveränderung

Die Daten der Knochenmasseveränderung sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Das Vorhandensein des C-Allels des IL-1 β (+3954) Gens war mit einem signifikant erhöhten Knochenmasseverlust im Bereich des Femurhalses assoziiert. An der Wirbelsäule konnte eine Tendenz für den protektiven Effekt des T-Allels gezeigt werden, (keine Signifikanz, $p=0.1$).

Es bestand keine Assoziation zwischen dem Vorhandensein des seltener vorkommenden T-Allels des IL-1 β (-511) Gens und dem Verlust von Knochenmasse bei CED-Patienten.

Tendenziell schützte das Vorhandensein des 240 Allels des IL-1ra Gens vor Knochenmasseverlust an allen Messpunkten, jedoch erreichten die Unterschiede keine Signifikanz.

3.3.5 Das genetische protektive IL-1ra und IL-1 β Profil bei CED

Das Vorhandensein des T-Allels des IL-1 β (+3954) und des 240 Allels des IL-1ra schützen vor einem erhöhten Knochenmasseverlust. Diejenigen Patienten (n=30), die weder ein protektives T-Allel des IL-1 β (+3954), noch ein protektives 240 Allel des IL-1ra besaßen, litten unter einem erhöhten Knochenmasseverlust und wurden somit als Risikopatienten für den Knochenmasseverlust definiert (siehe Abbildung 1 und Tabelle 5). Patienten, die mindestens ein protektives T-Allel des IL-1 β (+3954) oder ein 240 Allel des IL-1ra Gens besaßen, wurden somit in der Gruppe der Patienten ohne genetisches Risiko zusammengefasst. Es war ebenfalls ein Trend zu einem höheren Steroidgebrauch in der Risikogruppe im Vergleich zu der Gruppe ohne genetisches Risiko zu erkennen (siehe Tabelle 5).

4. Diskussion

Eine Vielzahl von extraintestinalen Symptomen und Komplikationen sind bei den CED bekannt. Zu diesen gehört auch die CED-assoziierte Osteoporose, die zum einen direkt auf die chronisch entzündliche Darmkrankheit, zum anderen aber auch auf deren Behandlung zurückzuführen ist. Es besteht immer noch kein Konsens über die Therapie der Osteoporose bei CED. Die frühzeitige Identifikation von CED-Patienten, die ein erhöhtes Risiko für einen schnellen Knochenmasseverlust besitzen, stellt eine Herausforderung dar- besonders wenn man die Unsicherheit der Ärzte in Bezug auf die Prävention der Osteoporose bei den meist jungen Patienten berücksichtigt (2: Bernstein, Leslie, Leboff 2003).

Die genetische Konstitution des Organismus, die auf systemische Entzündungen einwirkt, scheint definierte organspezifische Erkrankungen zu verursachen. Osteoporose kann durch eine systemische Entzündung indiziert oder verschlimmert werden, was die Bedeutung einer unregulierten systemischen Entzündung auf den Knochenmasseverlust zeigt. Folglich sind genetisch determinierte Variationen der proinflammatorischen Zytokine als Ursache für die durch Entzündung vermittelte Osteoporose von speziellem Interesse.

Interleukin-1 und sein natürlich vorkommender Antagonist Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) sind Zytokine, denen eine zentrale Rolle in der Regulation von Entzündungen zukommt (8: Papanicolaou, Wilder, Manolagas, Chrousos 1998). Es wurde gezeigt, dass das Verhältnis zwischen IL-1ra und IL-1 β mit der Stärke der Entzündung assoziiert ist (26: Casini-Raggi et al. 1995) (27: Dinarello 1996). Zusätzlich regulieren die genannten Zytokine den Knochenumbau, indem sie über das OPGL-RANKL-System Einfluss auf diesen nehmen (36:

Manolagas, Jilka 1995) (37: Manolagas 1995). Der seltener vorkommende TT-Genotyp des IL-1 β (-511) Polymorphismus ist mit einem erhöhten IL-1 β Serum- und Mukosa-Level assoziiert (22: Danis, Millington, et al. 1995) (38: Mattila, Rinne et al. 2002) (21: Hwang, Kodama et al. 2002). Die beschriebene Assoziation zwischen den -511 T-Allelen und entzündlichen Erkrankungen spiegelt die erhöhte IL-1 β Produktion dieses Polymorphismus wider (27: Dinarello 1996) (39: Taylor 2002) (28: di Giovine 1992). Der seltener vorkommende TT-Genotyp des IL-1 β (+3954) Polymorphismus ist mit einer im Vergleich zu dem heterozygoten Genotyps und dem homozygoten CC-Genotyps erhöhten in vitro IL-1 β Produktion assoziiert (29: Poicot. 1992). Das seltener vorkommende IL-1ra 240 Allel ist mit einer erhöhten IL-1ra Produktion assoziiert.

Für die Erkrankungsaktivität bzw. die Intensität der Entzündung der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten, die wir retrospektiv und prospektiv bestimmten, dienten der klinische Verlauf, die Anzahl chirurgischer Interventionen oder die Intensität der immunsuppressiven Therapie als Surrogatparameter. Die Polymorphismen des IL-1 β und des IL-1ra-Gens hatten keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der CED, weder bei der retrospektiven Analyse zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung, noch während der prospektiven Verlaufskontrolle nach einem Zeitraum von zwei Jahren.

Wir untersuchten, ob der prospektiv beobachtete Knochenmasseverlust durch die Polymorphismen der IL-1 β und IL-1ra Gene beeinflusst war. Verschiedenste Faktoren nehmen Einfluss auf die Veränderung der Knochenmasse. Das Alter (40: Bernstein 2000) (41: Loftus 2002), die Erkrankungsaktivität (42: van Staa 2003), der Steroidgebrauch (43: Card 2004) (44: Bernstein 2003) und die Änderung der Körperzusammensetzung (45: Jahnsen 2003) werden als Hauptdeterminanten der

Knochenmasseveränderung angesehen. Das Vorkommen von Osteoporose und osteoporotisch bedingten Frakturen bei CED-Patienten während des Erkrankungszeitraums, das Alter des Erkrankungsbeginns (46: Bernstein 2003), das Geschlecht und der Calcium/Vitamin D Metabolismus (47: Bernstein 2003) besitzen hingegen einen kleineren Einfluss. Um Fehler, bedingt durch ein Vermischen von altersabhängiger und krankheitsspezifischer Veränderung der Knochenmasse, zu reduzieren, schlossen wir alle Patienten, die älter als fünfzig Jahre waren, von der Studie aus. Die durchschnittliche Knochenmasseveränderung war in der Gruppe der jungen CED-Patienten sogar positiv, was die positive Nachricht für junge CED-Patienten darstellt (48: Ullman 2003). Jedoch zeigte die Knochenmasseveränderung große individuelle Unterschiede und ein rascher Knochenverlust (definiert als Knochenmasseverlust $> 2\%$ pro Tag) kam bei 15% der Patienten an der Wirbelsäule, bei 26% am Femurhals und bei 30% am Ward Dreieck vor.

Die Knochenmasseveränderung konnte weder durch das Alter, noch durch die Körperzusammensetzung oder durch die Veränderung der Körperzusammensetzung, durch die Krankheitsaktivität oder den Steroidgebrauch erklärt werden. In dieser Hinsicht stimmten unsere Daten mit der Literatur überein (43: Card 2004) (49: Motley 1993) (50: Staun 1997).

Wir konnten zeigen, dass das Fehlen des T-Allels des IL-1 β (+3954) mit einem erhöhten Knochenmasseverlust bei CED einherging. Der Polymorphismus des IL-1 β (-511)-Gens spielte beim CED-assoziierten Knochenverlust keine Rolle. Eine gemeinsame Analyse des IL-1 β (+3954)- und des IL-1ra-Polymorphismus zeigte, dass ca. ein Drittel der untersuchten CED-Patienten ein erhöhtes Risiko für einen schnellen Knochenmasseverlust besaßen. Das gemeinsame Fehlen der T-Allele des IL-1 β (+3954) und der 240 Allele des IL-1ra war im Vergleich zu Patienten, die

mindestens einen protektiven Polymorphismus besaßen, mit einem beschleunigten Knochenmasseverlust assoziiert. Der gefundene Unterschied konnte nicht auf den Krankheitsverlauf oder auf die Größe der Entzündung zurückgeführt werden, obwohl der Steroidgebrauch bei den Risikopatienten im Vergleich zu den Nicht-Risikopatienten leicht erhöht war. Es lag nicht im Bereich dieser Studie, die pathophysiologischen Mechanismen zu klären, die dem beobachteten Effekt der spezifischen IL-1 β und IL-1ra Genotypen auf den CED-assoziierten Knochenmasseverlust zugrunde liegen.

Angesichts der Unsicherheit bei der Risiko-Einschätzung für einen beschleunigten Knochenverlust bei CED durch klinische Parameter allein, müssen andere Determinanten, wie etwa genetische Faktoren, identifiziert werden. Jedoch sind prospektiv konzipierte Studien mit einer größeren Anzahl von CED-Patienten selten. Die Vielzahl von genetischen und durch die Umwelt bedingten Effekten auf den CED-assoziierten Knochenverlust ergeben bis jetzt noch kein komplettes Bild, aber das Mosaik wächst Stück um Stück. Diese Arbeit fügte das Stück der IL-1 β /IL-1ra Polymorphismen als eine der Determinanten für den CED-assoziierten Knochenmasseverlust bei. Wir hoffen, dass weitere Untersuchungen in diesem Bereich verschiedene Genotypen/ Phänotypen für den CED-assoziierten Knochenmasseverlust identifizieren werden. Somit bestünde in Zukunft die Möglichkeit, Risikopatienten rechtzeitig zu erkennen und für sie, gemäß ihrem Risikoprofil, eine präventive Strategie (51: Haderslev 2000) zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Die Osteoporose ist eine wichtige Komplikation der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten (CED). Die Klärung der exakten Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmkrankheiten steht aus. Wir wissen jedoch, dass das Zusammenspiel verschiedener Zytokine mit immunregulatorischer und proinflammatorischer Wirkung zur ihrer Pathogenese beiträgt. Eine systemische Entzündung kann das Ausmass einer Osteoporose beeinflussen. Folglich könnten genetisch determinierte Variationen der proinflammatorischen Zytokine Auswirkung auf den CED-assoziierten Knochenmasseverlust haben. In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob der prospektiv beobachtete Knochenmasseverlust bei CED-Patienten mit zwei verschiedenen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen des Interleukin-1 β -Gens sowie mit einem VNTR-Polymorphismus der IL-1ra-Gens assoziiert ist. Die Genotypisierung erfolgte durch DNA-Isolation, Polymerase-Kettenreaktion, sequenzspezifischen Restriktionsenzymverdau der Amplimere und Agarosegelelektrophorese. Die Knochendichte wurde mittels Dual Energy X-Ray Absorptiometrie bestimmt.

Wir konnten zeigen, dass das Fehlen des T-Allels des IL-1 β Polymorphismus +3954 mit einem erhöhten Knochenmasseverlust bei CED einherging. Der -511 Polymorphismus des IL-1 β -Gens spielte für den Knochenverlust keine Rolle. Eine gemeinsame Analyse des IL-1 β (+3954)- und des IL-1ra-Polymorphismus zeigte, dass das gemeinsame Fehlen der T-Allele des IL-1 β (+3954) und der 240 Allele des IL-1ra im Vergleich zu Patienten, die mindestens einen protektiven Polymorphismus besaßen, mit einem beschleunigten Knochenmasseverlust assoziiert war. Während eine solche Assoziation keine unmittelbaren Rückschlüsse über den wirksamen biologischen Zusammenhang zulässt, kann sie doch helfen, Risikopatienten zu erkennen. Dies hat Bedeutung für Studienzwecke. Das hier beschriebene genetische Risikoprofil ist ein

Ansatzpunkt zur Entwicklung von Strategien zur Prävention der Osteoporose bei chronisch entzündlicher Darmerkrankung.

6. Glossar

Allel

Eine von zwei oder mehr alternativen Formen eines einzigen Genortes. Verschiedene Allele eines Gens haben jeweils eine eigene Nukleotidsequenz und ihre Aktivität bezieht sich auf denselben biochemischen Prozess, obwohl ihre individuellen Phänotypen sich unterscheiden können.

Allelfrequenz

Die Häufigkeit eines Allels an einem bestimmten Genort, die bei den Individuen einer Population auftritt.

Amplifikation

Vervielfältigung eines DNA-Abschnittes mit Hilfe der \rightarrow PCR.

Amplimer

DNA-Abschnitt, der mit Hilfe der \rightarrow PCR vervielfältigt wurde.

Annealing

(engl. f. kühlen, ausglühen) Vorgang des Bindens eines Oligonukleotidprimers an eine spezifische Sequenz eines DNA-Einzelstranges während des Abkühlungsschrittes der \rightarrow PCR.

C-511T-IL-1 β -Polymorphismus

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in Position -511, also 511 Basenpaare stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes des IL-1 β Gens. Es liegt ein Basenaustausch von C (Cytosin) zu T (Thymin) vor, wodurch eine spezifische Restriktionsschnittstelle entsteht.

C+3954T- IL-1 β -Polymorphismus

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in Position +3954, also 3954 Basenpaare stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes des IL-1 β Gens. Es liegt ein Basenaustausch von C (Cytosin) zu T (Thymin) vor, wodurch eine spezifische Restriktionsschnittstelle entsteht.

CED

Abk. f. chronische entzündliche Darmkrankheiten, zu denen die Colitis ulcerosa und der → Morbus Crohn zählen.

Chromosom

Das genetische Material der Zelle, in einem Komplex mit Proteinen, organisiert in einer Anzahl von linearen Strukturen. Wörtlich bedeutet es „farbiger Körper“, weil die fadenartigen Strukturen unter dem Mikroskop nur nach Anfärbung sichtbar sind.

Codon

Eine Gruppe von drei benachbarten Nukleotiden in einem mRNA-Molekül, die entweder eine Aminosäure in einer Polypeptidkette, oder das Ende der Polypeptidsynthese festlegen.

CU

Abk. f. Colitis ulcerosa.

DNA

Abk. f. *desoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure. Polymeres Molekül, das aus Desoxyribonukleotid-Bausteinen besteht und in Form einer doppelsträngigen Doppelhelix das genetische Material der meisten Organismen bildet.

EDTA

Abk. f. *ethylene diamine tetraacetic acid*, Ethylendiamintetraessigsäure.

Expression

→Genexpression

Gastrektomie

Totale operative Magenentfernung unter Mitnahme von regionalen Lymphknoten und anschließender Rekonstruktion des Verdauungsweges durch Ersatzmagenbildung.

Gen

Der bestimmende Faktor eines Charakteristikums eines Organismus. Genetische Information wird in Form von DNA kodiert, die für die Unterschiedlichkeit der Arten und Individuen verantwortlich ist. Die Nukleotidsequenz eines Gens spezifiziert ein Polypeptid oder ein RNA-Molekül und unterliegt der Veränderung durch Mutation.

Genetische Varianz

Genetische Quelle phänotypischer Variation zwischen Individueneiner Population. Additive genetische Varianz.

Genexpression

Der Grad, in welchem ein bestimmter Genotyp in dem →Phänotyp ausgedrückt wird.

Genotyp

Die vollständige genetische Zusammensetzung eines Organismus.

Glukokortikoide

Eine Gruppe von Steroidhormonen, die zum einen in der Nebenniere gebildet werden, als auch synthetisch hergestellt als Medikament genutzt werden. Sie besitzen unter anderem eine entzündungshemmende Wirkung.

Glutensensitive Enteropathie

syn.: einheimische Sprue, Zöliakie; das in allen Getreidesorten vorkommende Gluten kann zu einer schweren Veränderung der Dünndarmschleimhaut führen.

Haploid

Die einfach vorhandene Erbanlage.

Heterozygotie

bezüglich eines Genlokus: Eigenschaft eines Individuums, bei dem derselbe Genlokus auf den homologen Chromosomen durch zwei verschiedene Allele besetzt ist.

Homozygot

bezüglich eines Genlokus: Eigenschaft eines Individuums, bei dem derselbe Genlokus auf den homologen Chromosomen durch zwei gleichartige Allele besetzt ist.

IL-1 β

Abk. f. Interleukin-1 beta.

IL-1ra

Abk. f. Interleukin-1 Rezeptorantagonist.

Lupus erythemathodes, systemischer

generalisierte Autoimmunerkrankung unklarer Ätiologie.

MC

Abk. f. Morbus Crohn.

Multiple Sklerose

primär entzündliche Erkrankung des ZNS mit herdförmiger Entmarkung.

Oligonukleotidprimer

→Primer

PCR

Abk. f. *polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion, Methode, die benutzt wird, um aus einer DNA-Mixtur definierte DNA-Sequenzen selektiv und wiederholt zu replizieren.

Polymorphismus

→Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus RFLP.

Prävalenz

Häufigkeit einer bestimmten Krankheit oder eines bestimmten Merkmals zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Primer

Eine vorgeformte Polynukleotidkette, zu welcher bei der DNA-Replikation neue Nukleotide hinzugefügt werden können.

Promotor

Eine spezifische regulatorische Nukleotidsequenz in der DNA, an welche die RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription bindet.

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus RFLP

Aus der unterschiedlichen Verteilung von Schnittstellen (z.B. durch Punktmutationen entstanden) für Restriktionsenzyme resultierende unterschiedliche Fragmentlängen der geschnittenen oder nicht geschnittenen DNA-Teilstücke. Restriktionsfragmente verschiedener Länge werden zum Beispiel mit Hilfe von Elektrophoresegelele nachgewiesen.

Restriktionsenzym

(Restriktionsendonuklease) Enzyme, die für die DNA-Analyse und die Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle wegen ihrer Fähigkeit, doppelsträngige DNA-Moleküle an spezifischen Nukleotidpaarsequenzen zu schneiden, wichtig sind.

Restriktionsverdau

Vorgang des Schneidens doppelsträngiger DNA-Moleküle an spezifischen Nukleotidpaarsequenzen durch Restriktionsenzyme.

Rückwärtsprimer

Bei der PCR verwendeter Primer für den Rückwärtsstrang, zu dem bei der Extension des komplementären Stranges neue Nukleotide entgegen der Leserichtung des Gens hinzugefügt werden. Wird zusammen mit einem Vorwärtsprimer verwendet.

Transkriptionsstartpunkt

Auf den Promotor folgende DNA-Region, an der die RNA-Synthese beginnt.

VNTR-Polymorphismus

Abk. f. *various number of tandem repeat* Polymorphismus.

Vorwärtsprimer

Bei der PCR verwendeter Primer für den Vorwärtsstrang, zu dem bei der Extension des komplementären Stranges neue Nukleotide in Leserichtung des Gens hinzugefügt werden. Wird zusammen mit dem Rückwärtsprimer verwendet.

7. Literatur

1. Ray NF, Chan JK, Thamer M, Melton LJI. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: Report from the National Osteoporosis Foundation. *Journal of Bone and Mineral Research* **12**, 24-35 (1997).
2. Lindsay R. Osteoporosis: A Guide to Diagnosis, Prevention and Treatment. National Osteoporosis Foundation. *Raven Press*, (1992).
3. Bernstein CN, Leslie WD, Leboff MS. AGA technical review on osteoporosis in gastrointestinal diseases. *Gastroenterology* **124** (3), 795-841 (2003).
4. Duchmann R, Zeitz M. Crohn's disease. In: Orga P, Strober W, editors. *Handbook of mucosal immunology*. San Diego: Academic Press; 1005 (1999).
5. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *American Journal of Gastroenterology* **92**, 5-11 (1997).
6. Marshall D, Johnell O, Wedel H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. *British Medical Journal* **312**, 1254-1259 (1996).
7. Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* **115**, 182-205 (1998).
8. Cominelli F, Pizarro TT. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology Therapy* **10**, 49-53 (1996).
9. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine* **128**, 127-137 (1998).
10. Christiansen C, Riis BJ, Rodbro P. Prediction of rapid bone loss in postmenopausal women. *Lancet* **1**, 1105-1108 (1987).
11. Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocrine Reviews* **23**, 303-326 (2002).
12. Ralston SH. Genetic determinants of susceptibility to osteoporosis. *Current Opinion in Pharmacology* **3** (3), 286-290 (2003).
13. Xiong DH, Long JR, Recker RR, Deng HW. Pharmacogenomic approaches to osteoporosis. *Pharmacogenomics Journal* **3** (5), 261-263 (2003).
14. Zajickova K, Zofkova I. Osteoporosis: genetic analysis of a multifactorial disease. *Endocrinological regulations* **37** (1), 31-44 (2003).
15. Liu Y-Z, Liu YJ, Recker RR, Deng H. Molecular studies of identification of genes for osteoporosis: the 2002 update. *Journal of Endocrinology* **177**, 147-196 (2003).
16. Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Yue F, McGuigan F, Grant SFA, et al. Relation of alleles of the collagen Ia gene to bone density and the risk of osteoporotic

fractures in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine* **338**, 1016-1021 (1998).

16. Styrkarsdottir U, Cazier J-B, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, et al. Linkage of Osteoporosis to Chromosome 20p12 and Association to BMP2. *PLOS Biology* **1** (3), 351-360 (2003).

17. Minne HW, Pfeilschifter J, Scharla S, Mutschelknauss S, Schwarz A, Krempien B, et al. Inflammation mediated osteopenia in the rat: a new animal model for pathological loss of bone mass. *Endocrinology* **115**, 50-54 (1984).

18. Kong Y-Y, Boyle WJ, Penniger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunology Today* **21**, 495-502 (2000).

19. Schulte CM, Dignass AU, Goebell H, Röher H-D, Schulte K-M. Genetic factors determine the extent of bone loss in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **119** (4), 909-920 (2000).

20. Nicklin M, Weith A, Duff GW. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* **19**, 382-384 (1994).

21. Hwang IR, Kodama T, Kikuchi S, Sakai K, Peterson LE, Graham DY, et al. Effect of interleukin 1 polymorphisms on gastric mucosal interleukin 1 beta production in *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* **123** (6), 1793-1803 (2002).

22. Danis VA, Millington M, Hyland VJ. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) gene polymorphism. *Clinical and Experimental Immunology* **99**, 303-310 (1995).

23. Schrijver HM, Crusius JB, Uitdehaag BM, Garcia Gonzalez MA, Kostense PJ, Polman CH, et al. Association of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist gene with disease severity in MS. *Neurology* **52** (3), 595-599 (1999).

24. Blakemore AI, Tarlow JK, Cork MF, Gordon C, Emery P, Duff GW. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* **37**, 1380-1385 (1994).

25. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, et al. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* **106**, 637-642 (1994).

26. Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Journal of Immunology* **154**, 2434-2440 (1995).

27. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**, 2095-2147 (1996).

28. di Giovine FS, Takhsh E, Blackmore AI, Duff GW. Single base polymorphism at -511 in the human interleukin-1 beta gene (IL-1 gene). *Human Molecular Genetics* **1** (6), 450 (1992)

29. Pociot F, Molvig J, Wogensen L, Worsaae H, Nerup J. A Taq1 polymorphism in the human interleukin-1 β (IL-1 β) gene correlates with IL-1 β secretion in vitro. *European Journal Clinical Investigation* **22**, 396-402 (1992).
30. Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of the IL-1ra allele 2 (IL1RN*2) is associated with enhanced IL-1 β production in vitro. *Scandinavian Journal of Immunology* **47**, 195-198 (1998).
31. Gasche C, Schölmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer S, Irvine EJ, et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory Bowel Diseases* **6** (1), 8-15 (2000).
31. Laun RA, Schröder O, Schoppnies M, Ekkernkamp A, Röher H-D, Schulte K-M. Transforming growth factor beta 1 and major trauma – the time dependent association with hepatic and renal insufficiency. *Shock* **19**, 16-23 (2003).
32. Schröder O, Laun RA, Sreubel S, Sittnick F, Ekkernkamp A, Mutze S, et al. Association of pro- and antiinflammatory cytokine polymorphisms with the incidence of acute respiratory failure following major trauma. *still in press*.
33. Kanis JA, Glüer C-C. An update on the diagnosis and assessment of osteoporosis with densitometry. *Osteoporosis International* **11**, 192-202 (2000).
34. Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Human Genetics* **91**, 403-404 (1993).
35. Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, Chrousos GP. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. *Annals of Internal Medicine* **128** (2), 127-137 (1998).
36. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. *New England Journal of Medicine* **332**, 305-311 (1995).
37. Manolagas SC. Role of Cytokines in Bone Resorption. *Bone* **17**, 63S-67S (1995).
38. Mattila KM, Rinne JO, Lehtimäki T, Roytta M, Ahonen JP, Hurme M. Association of an interleukin-1 β gene polymorphism (-511) with Parkinson's disease in Finnish patients. *Journal of Medical Genetics* **39** (6), 400-402 (2003).
39. Taylor SL, Renshaw BR, Garka KE, Smith DE, Sims JE. Genomic organization of the interleukin-1 locus. *Genomics* **79**, 726-733 (2002).
40. Bernstein CN, Blanchard JF, Leslie W, Wajda A, Yu BN. The incidence of fracture among patients with inflammatory bowel disease. A population-based cohort study. *Annals of Internal Medicine* **133**, 795-799 (2000).
41. Loftus EV, Jr., Crowson CS, Sandborn WJ, Tremaine WJ, O'Fallon WM, Melton LJ, Jr. Long-term fracture risk in patients with Crohn's disease: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *Gastroenterology* **123** (2), 468-75 (2002).

42. van Staa TP, Cooper C, Leufkens H, Javaid MK, Arden NK. Inflammatory bowel disease and the risk of fracture. *Gastroenterology* **125** (6), 1591-1597 (2003).
43. Card T, West J, Hubbard R, Logan RFA. Hip fractures in patients with inflammatory bowel disease and their relationship to corticosteroid use: a population based cohort study. *Gut* **53**, 251-255 (2004).
44. Bernstein CN, Blanchard JF, Metge C, Yogendran M. The association between corticosteroid use and development of fractures among IBD patients in a population-based database. *American Journal of Gastroenterology* **98** (8), 1797-1801 (2003).
45. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, Aadland E. Body composition in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *American Journal of Gastroenterology* **98** (7), 1556-1562 (2003).
46. Bernstein CN, Leslie WD, Taback SP. Bone density in a population-based cohort of postmenopausal adult women with early onset inflammatory disease. *American Journal of Gastroenterology* **98** (5), 1094-1100 (2003).
47. Bernstein CN, Bector S, Leslie WD. Lack of relationship of calcium and vitamin D intake to bone mineral density in premenopausal women with inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* **98** (11), 2468-2473 (2003).
48. Ullman T. Hold the bone: good news for young women with IBD. *Inflammatory bowel disease* **9** (6), 396-397 (2003).
49. Motley RJ, Clements D, Evans WD, Crawley EO, Evans C, Rhodes J, et al. A four-year longitudinal study of bone loss in patients with inflammatory bowel disease. *Bone and mineral* **23** (2), 95-104 (1993).
50. Staun M, Tjellesen L, Thale M, Schaadt O, Jarnum S. Bone mineral content in Patients with Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* **32**, 226-232 (1997).
51. Haderslev KV, Tjellesen L, Sorensen HA, Staun M. Alendronate increases lumbar spine bone mineral density in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **119**, 639-646 (2000).

8.Anhang: Tabelle 1: Charakteristika der Studienpopulation bei Eintritt in die Studie: Subanalyse in Abhängigkeit der Polymorphismen des IL-1 β (+3954)- und des IL-1ra (240)-Gens.

	Alle Patienten N= 109	IL-1 β (+3954)		IL-1ra (240)	
		T Allel + N= 29	T Allel - N= 80	240 Allel + N= 40	240 Allel - N= 69
Alter (Jahre)	32 \pm 8	32 \pm 8	32 \pm 7	31 \pm 8	32 \pm 8
Geschlecht (M:F)*	55:45	63:37	58:42	55:45	57:43
BMI (kg/m ²)	22,5 \pm 3,4	22,7 \pm 3,9	22,1 \pm 2,7	22,0 \pm 0,6	22 \pm 0,5
Körperfettanteil (%)	28 \pm 10	28 \pm 10	28 \pm 10	29 \pm 10	28 \pm 10
Alter bei Diagnosestellung (Jahre)	23 \pm 8	23 \pm 9	23 \pm 8	21 \pm 7	24 \pm 8
Zahl der unter 18 Jährigen bei Erstdiagnose*	24	26	19	22	28
Dauer der Erkrankung (Jahre)	10 \pm 6,7	9,2 \pm 5,5	9,9 \pm 7,3	9,7 \pm 1,1	9,4 \pm 0,9
akute Schübe pro Erkrankungsjahr	1,2 \pm 1,2	1,2 \pm 1,2	1,2 \pm 1,1	1,7 \pm 1,4	1,0 \pm 1,0 **
<u>Morbus Crohn:</u>	N= 77	N= 41	N= 36	N= 27	N= 50
-Wien ^o A1:A2*	97:3	100:0	96:4	100:0	97:3
-Wien ^o L1:L2:L3:L4*	16:30:32:22	21:34:28:17	16:28:36:20	10:25:50:15	16:29:31:24
-Wien ^o B1:B2:B3*	25:10:65	14:10:76	32:16:52	25:10:65	19:10:71
-alle chirurgischen Interventionen*	73	83	67	72	81
- chir. Eingriffe/ Erkrankungsjahr	0,25 \pm 0,4	0,36 \pm 0,57	0,17 \pm 0,22	0,22 \pm 0,17	0,32 \pm 0,52
<u>Colitis ulcerosa:</u>	N= 32	N= 11	N= 21	N= 13	N= 19
-Pancolitis: Linksseitencolitis: Proktitis*	42:18:40	44:11:45	50:23:27	64:9:27	33:13:54
- durchgeführte Colektomie*	6	0	11	9	0
<u>Immunsuppressive Therapie:</u>					
-Keine: Steroide: Steroide + Azathioprin*	18:64:18	19:60:21	20:63:14	26:58:16	19:70:11
-Steroidmenge seit Diagnosestellung	16 \pm 34	17 \pm 28	15 \pm 17	15 \pm 19	19 \pm 29
(g total) Prednisolon-Äquivalent					
-Steroidmenge seit Diagnosestellung	5 \pm 10	5 \pm 7	5 \pm 6	5 \pm 6	6 \pm 9
(mg/ tag) Prednisolon-Äquivalent					
Knochenmasse bei Erstuntersuchung:					
-Z-Score Wirbelsäule	-0,53 \pm 1,2	-0,6 \pm 1,1	-0,3 \pm 1,1	-0,43 \pm 1,1	-0,40 \pm 1,2
-Z-Score Femurhals	-0,63 \pm 1,4	-0,6 \pm 1,5	-0,45 \pm 1,3	-0,99 \pm 1,0	-0,30 \pm 1,6
-Z-Score Ward'sches Dreieck	-0,50 \pm 1,5	-0,45 \pm 1,6	-0,37 \pm 1,4	-0,85 \pm 1,1	-0,23 \pm 1,6

Legende zur Tabelle 1:

* Angaben in %

^o gemäß der Wiener Klassifikation:

-Alter:

Diagnosestellung)

-Lokalisation:

-Krankheitsverhalten:

A1 (< 40 Jahre zum Zeitpunkt der

A2 (> 40 Jahre zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung)

L1 (terminales Ileum)

L2 (Colon)

L3 (Ileum+ Colon)

L4 (oberer Gastrointestinaltrakt)

B1 (keine Strikturen, keine Perforationen)

B2 (Strikturen)

B3 (Perforationen)

** P = <0.05

Tabelle 2: Charakteristika der Studienpopulation zum Zeitpunkt der Verlaufskontrolle: Subanalyse in Abhängigkeit der Polymorphismen des IL-1 β (+3954)- und des IL-1ra-Gens

	Alle Patienten N= 109	IL-1 β (+3954)		IL-1ra (240)	
		T Allel + N= 29	T Allel - N= 80	240 Allel + N= 40	240 Allel - N= 69
Veränderung des Body Mass Index					
-gesamte Körpermasse (kg)	+1,4 \pm 5,4	+1,2 \pm 3,8	+2,6 \pm 6,2	+1,8 \pm 4,8	+1,4 \pm 5,9
- Muskelmasse (kg)	+0,7 \pm 2,8	+0,3 \pm 1,3	+1,3 \pm 3,7	+0,9 \pm 3,2	+0,9 \pm 2,8

- Fettmasse (kg)	+0,7 ± 4,4	+0,8 ± 3,3	+1,3 ± 4,4	+0,9 ± 2,7	+0,5 ± 3,9
<i>Chirurgische Eingriffe bei Morbus Crohn</i>					
-alle chirurgischen Interventionen*	14	17	8	20	11
-Zahl der chir. Eingriffe/ Erkrankungsjahr ^o	0,6 ± 0,18	0,5 ± 0,13	0,7 ± 0,15	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1
<i>Chirurgische Eingriffe bei Colitis ulcerosa</i>					
-durchgeführte Colectomie*	3	0	6	3	3
Immunsuppressive Therapie					
-Keine*	53	56	49	52	55
-nur Steroide*	25	18	30	26	23
-nur Azathioprin*	7	8	7	8	6
-Steroide + Azathioprin*	15	18	14	14	16
-Steroide bis zur Verlaufskontrolle (mg/ tag) Prednisolon-Äquivalent	3,0 ± 7	2,0 ± 3,7	3,7 ± 6,5	2,9 ± 4,4	3,1 ± 6,4

Legende zur Tabelle 2:

*Angaben in %

^o Die Zahl ist für diejenigen Patienten errechnet worden, bei denen mindestens ein chirurgischer Eingriff durchgeführt wurde.

Tabelle 3: Die Knochenmasseveränderung bis zum Zeitpunkt der Verlaufskontrolle im Verhältnis zu den IL-1ra und IL-1 β Genotypen

	Wirbel	p-Wert	Femurhals	p-Wert	Ward'sches Dreieck	p-Wert
<i>Alle Patienten</i> N= 109	+0,27 \pm 3,0		+0,66 \pm 5,3		1,14 \pm 7,3	
IL-1 β (+3954) T+ N= 29	+0,89 \pm 2,3		+2,50 \pm 4,7		+2,90 \pm 6,7	
IL-1 β (+3954) T- N= 80	-0,30 \pm 3,8	0,1	-1,30\pm5,5	0,02*	-0,90\pm8,3	0,04*
IL-1ra 240+ N= 40	+0,68 \pm 2,7		+1,50 \pm 4,8		+3,50 \pm 7,4	
IL-1ra 240- N= 69	+0,05 \pm 3,4	0,2	+0,60 \pm 6,3	0,08	+0,24 \pm 7,9	0,06
IL-1 β (-511) T+ N= 45	+0,25 \pm 3,6		+0,34 \pm 5,5		+1,50 \pm 8,5	
IL-1 β (-511) T- N= 64	+0,03 \pm 2,3	0,8	+0,30 \pm 4,9	0,97	-0,42 \pm 4,8	0,30

Legende zu Tabelle 3.2.-1: Die Knochenmasseveränderung ist als % pro Jahr (positive Daten bedeuten einen Knochenzuwachs, negative Daten stehen für den Knochenverlust) dargestellt.
Die mit * gekennzeichneten Daten der mittels T-Test bestimmten P-Werte erreichen Signifikanz-Niveau (p<0.05)

Tabelle 4: Allelfrequenz und Haplotyp -Verteilung des IL-1 β und des IL-1ra Gens bei Patienten mit CED, sowie klassifiziert für MC und CU und die gesunde Kontrolle

	<u>Alle CED</u>	<u>MC</u>	<u>CU</u>	<u>Kontrolle</u>	<u>Literatur</u>
<u>IL-1β (+3954)</u>					
IL-1 β (+3954) T +	26,6	30,5	18,5	23,5	27
IL-1 β (+3954) C +	73,4	69,5	81,5	76,5	73
IL-1 β (+3954) Haplotyp TT	6,2	7,4	3,7	7	8
IL-1 β (+3954) Haplotyp CT	40,8	46,3	29,6	33	38
IL-1 β (+3954) Haplotyp CC	53	46,3	66,7	60	54
<u>IL-1β (-511)</u>					
IL-1 β (-511) T +	41,7	41,3	42,3	38	43
IL-1 β (-511) C +	58,3	58,7	57,7	62	57
IL-1 β (-511) Haplotyp TT	15,5	15,5	15,4	12	20
IL-1 β (-511) Haplotyp CT	52,4	51,7	53,8	52	46
IL-1 β (-511) Haplotyp CC	32,1	32,7	30,8	36	34
<u>IL-1ra</u>					
IL-1ra 240 +	37	34,5	42,3		55
IL-1ra 240 -	63	65,5	57,7		45
IL-1ra Haplotyp 410/410	63	65	58		52
IL-1ra Haplotyp 240/410	27	26	31		37
IL-1ra Haplotyp 240/240	10	9	11		9

Legende zu Tabelle 4:

Angaben in Prozent.

Abkürzungen:

CED: Chronisch entzündliche Darmkrankheiten

MC : Morbus Crohn

CU : Colitis ulcerosa

Abbildung 1: Knochenmasseveränderung in Abhängigkeit von Genotyp-Kombinationen des IL-1 β und IL-1ra-Gens

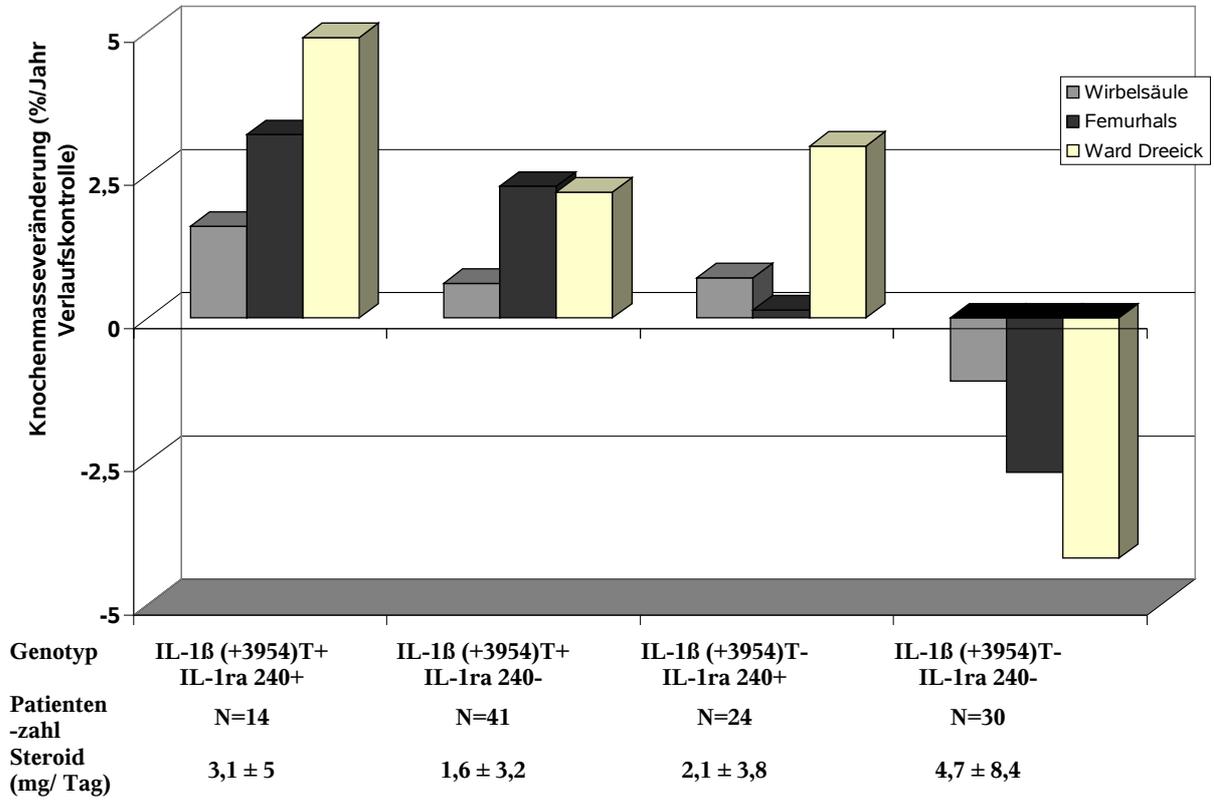


Tabelle 5: Ein gleichzeitiges Fehlen der T-Allele des IL-1 β (+3954) und der 240 Allele des IL-1ra ist mit einem beschleunigten Knochenmasseverlust bei CED-Patienten assoziiert

	Kein genetisches Risiko	Genetisches Risiko	
Wirbelsäule	+0,86 \pm 2,5*	-1,1 \pm 4,6*	p = 0,03
Femurhals	+1,80 \pm 4,9*	-2,7 \pm 6,5*	p = 0,004
Ward'sches Dreieck	+3,00 \pm 7,3*	-4,2 \pm 8,3*	p = 0,001
Steroidgebrauch	1,95 \pm 3,7**	4,7 \pm 8,4**	P = 0,07

Legende zu Tabelle 5:

°Kein genetisches Risiko: mindestens ist ein 240 Allel des IL-1ra oder ein T-Allel des IL-1 β (+3954) vorhanden.

*Knochenmasseveränderung in % pro Jahr (positive Werte entsprechen einem Zuwachs, negative Werte einem Knochenverlust).

** Angaben in mg Prednisolon / Tag

Abbildung 2**Patientenstammblatt: Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Name:

Vorname:

geb. am:

Station/Ambulanz:

Fragen zur chronisch entzündlichen Darmerkrankung:

Diagnose:

Erstdiagnose am

M.Crohn: oberer GI-Trakt (Ösophagus bis Jejunum)
 distaler Dünndarm
 Colon

CDAI:

Colitis ulcerosa: Pancolitis
 linksseitige Colitis
 Proktitis

CDI:

Primär sklerosierende Cholangitis: ja nein

Operationen/Resektionen:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

aktute Schübe/Jahr:

Dauer der Schübe:

Anthropometrische Daten:

Körpergröße:früher:.....
aktuelles Körpergewicht:
Körpergewicht 18.LJ. Körpergewicht 30.LJ.
Normalgewicht:
Idealgewicht:
BMI (kg/m²):
Griffstärke: re..... li.....
Hautfaltendicke Bizeps: re..... li.....
Oberarmumfang: re..... li.....

bei Frauen:

Menarche:
regelmäßiger Zyklus:
Beginn der letzten Periode:
Menopause:
Gyn.Op:
Hormonsubstitution:
seit:
Jahre tatsächlicher Östrogenexposition
Knochenschmerzen :
Frakturen:
WS-Deformation:
Knochendichte LWS:
Gesamtknochendichte:
C-reaktives Protein:
BSG:
Hb:

Abbildung 3**CED-Patienten: Termin 18 Monate**

Name:

Vorname:

Verlauf Chronisch entzündliche Darmerkrankung:

Diagnose:

Verlauf seit Erstuntersuchung:

Krankenhausaufenthalte:

Operationen:

Akute Schübe:

.....

Medikation: Präparat angeben

Corticosteroide: mg/die von bis..... Monate:.....

mg/die von bis..... Monate:.....

kumulative Dosis: (g)

aktuelles Cortison ?

topische Steroide seit.....

5-ASA-Derivate: g/die seit.....

sonstige regelmäßige Medikation:

.....

Knochenrelevante Medikation?

.....

Knochenschmerzen :

Frakturen:

Anthropometrische Daten

aktuelles Körpergewicht:

Griffstärke: re..... li.....
Oberarm: re..... li.....

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lars Bansemir
 Geb.-Datum: 02.05.1977
 Geb.-Ort: Solingen
 Eltern: Dr. rer. nat. Klaus Bansemir
 Anneliese Bansemir, geb. Buchkamp

Schulbildung

1983-1987 Grundschule Götscher Weg/ Langenfeld
 1987-1996 Konrad Adenauer Gymnasium/Langenfeld
 Mai 1996 Abitur

Bundeswehr

07.1996-04.1997 Sanitäter bei dem 1.Stabs- und Fernmelde-
 bataillon 820 Düsseldorf

Studium

04.1997-03.1999 Vorklinisches Studium HHU Düsseldorf
 März 1999 Abschluss der Vorklinik durch das
 Bestehen der ärztlichen Vorprüfung
 4.1999.3.2000 1.klinischer Studienabschnitt
 März 2000 Bestehen des 1. Staatsexamens
 04.2000-03.2002 2. klinischer Studienabschnitt
 September 2002 Bestehen des 2. Staatsexamens
 November 2003 Beendigung des Medizinstudiums durch
 Absolvierung des 3.Staatsexamens

Famulaturen

9.1999.10.1999 Allgemeine/ Unfallchirurgie,
 St.-Martinus-Krankenhaus Langenfeld
 2.2001.3.2001 Anästhesiologie,
 St.-Martinus-Krankenhaus Langenfeld
 8.2001.9.2001 Allgemeinmedizin,

2.2002.3.2002	Praxis Dr. med. Ina Flucke in Langenfeld Innere Medizin, St.-Martinus-Krankenhaus Langenfeld
Praktisches Jahr	
10.2002.1.2003	Chirurgie School of Medicine, University of Tasmania, Prof. Dr. P. Stanton
2.2003.5.2003	Radiologie, Städtische Kliniken D`dorf Prof. Dr. Christ
06.2003-09.2003	Innere Medizin, Städtische Kliniken D`dorf Prof. Dr. Königshausen
<u>Arzt im Praktikum</u>	
06.2004-10.2004	Deutsches Diabetes Zentrum Leibniz-Institut der HHU Düsseldorf
<u>Assistenzarzt</u>	
10.2004	Deutsches Diabetes Zentrum Leibniz-Institut der HHU Düsseldorf
01.2006	Helios Klinikum Wuppertal-Herzzentrum Universitätsklinik der Universität Witten/Herdecke

10. Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. K.-M. Schulte für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Zeit, die er sich nahm, um mir die Prinzipien wissenschaftlichen Arbeitens näher zu bringen.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. C. Schulte danke ich für die Bereitstellung der Proben und die von ihr erhobenen Patientendaten.

Frau K. Alemazkour und Frau B. Bosilj danke ich für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Labor.