

**Bedeutung von NOD2 Polymorphismen bei Patienten mit
Leberzirrhose und Aszites**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Martin Georg Gentemann

aus Iserlohn

2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Tilmann Sauerbruch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Achim Hörauf

Tag der Mündlichen Prüfung: 24.09.2014

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Allgemeine Innere Medizin
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie und Hepatologie,
Nephrologie, Infektiologie, Endokrinologie und Diabetologie

Direktor: Prof. Dr. C. P. Strassburg

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Leberzirrhose: Ätiologie, Pathogenese und ihre Komplikationen.....	6
1.2	Grundlagen der Aszitesbildung.....	8
1.3	Spontan bakterielle Peritonitis als Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites.....	10
1.3.1	Definition.....	10
1.3.2	Inzidenz und Pathomechanismus.....	10
1.3.3	Prognose.....	11
1.3.4	Historischer Überblick über unterschiedliche Definitionskriterien der Spontan bakteriellen Peritonitis.....	12
1.3.5	Klinische Zeichen einer Spontan bakteriellen Peritonitis	13
1.4	Diagnostische Untersuchung des Aszites.....	13
1.4.1	Aszites Parazentese und Zelldifferenzierung	13
1.4.2	Beimpfung von Bakterienkulturflaschen mit Aszites zur Diagnose der SBP.....	14
1.4.3	Prädiktive Faktoren für das Auftreten einer Spontan bakteriellen Peritonitis.....	15
1.4.4	Faktoren, die mit einer Spontan bakteriellen Peritonitis assoziiert sind.....	16
1.5	Die Bedeutung des NOD2 Proteins in der angeborenen Immunabwehr des Darmes.....	17
1.5.1	Die Familie der (NOD) - like Rezeptor Proteine.....	17
1.5.2	Die Struktur des NOD2 Proteins.....	17
1.5.3	Genexpression von Card15/NOD2.....	19
1.5.4	Intrazelluläre Signaltransduktion des NOD2 Weges.....	19
1.5.5	Assoziation von NOD2 Polymorphismen zu verschiedenen Syndromen und Erkrankungen.....	22
1.6	Fragestellung.....	25
2.	Patienten und Methoden	26
2.1	Patienten.....	26
2.2	Durchführung der Aszitesparazentese.....	27
2.3	Untersuchung des Punktats.....	28

2.3.1	Bestimmung von Gesamtzellzahl, Granulozyten und laborchemischen Parametern.....	28
2.3.2	Zytologische Untersuchung	28
2.3.3	Mikrobiologische Untersuchung.....	28
2.4	Genotypisierung der Patienten.....	28
2.4.1	Gewinnung der DNA.....	28
2.4.2	Detektion der Polymorphismen.....	29
2.5	Verlaufskontrolle und Bestimmung der Überlebenszeit	30
2.6	Statistik.....	30
3.	Ergebnisse	31
3.1	Patientencharakteristika.....	31
3.1.1	Unterschiede zwischen den Patienten in klinischen und laborchemischen Parametern.....	32
3.1.2	Therapie mit Antibiotika in beiden Gruppen.....	34
3.2	Häufigkeiten und relatives Risiko für Bakteraszites und SBP in den verschiedenen Gruppen.....	34
3.2.1	Auftreten von Bakteraszites in den verschiedenen Gruppen.....	34
3.2.2	Auftreten einer SBP retrospektiv und prospektiv in den verschiedenen Gruppen	36
3.2.3	Auftreten einer SBP nur prospektiv in den verschiedenen Gruppen.....	37
3.3	Überleben in den Gruppen.....	38
3.3.1	Todesursachen.....	38
3.3.2	Unterschiede in der Mortalität für die einzelnen Genotypen.....	40
3.3.4	Mortalität nach Child Grad.....	43
3.4	Risikofaktoren und Überlebenszeit.....	43
3.4.1	Univariate Risikofaktoren für die Überlebenszeit.....	43
3.4.2	Multivariate Risikofaktoren für die Überlebenszeit.....	43
4.	Diskussion	44
4.1	Einleitung.....	44
4.2	Die Bedeutung anderer Parameter für das Auftreten einer SBP.....	44

4.2.1	Vergleich beider Gruppen hinsichtlich ausgewählter Laborparameter.....	44
4.2.2	Einfluss einer antibiotischen Therapie.....	45
4.2.3	Häufigkeitsverteilung der einzelnen Polymorphismen im Kollektiv.....	46
4.3	Risiko für Bakteraszites und SBP bei heterozygoten Anlageträgern.....	46
4.3.1	Das Risiko für Bakteraszites bei heterozygoten Anlageträgern.....	46
4.3.2	Das Risiko für eine SBP bei heterozygoten Anlageträgern.....	48
4.4	Bedeutung der SNP8, 12 und 13 im CARD15 Gen für das Überleben der Patienten.....	49
5.	Zusammenfassung.....	51
6.	Anhang.....	53
7.	Literaturverzeichnis.....	55
8.	Danksagung.....	60

1. Einleitung

1.1 Leberzirrhose: Ätiologie, Pathogenese und ihre Komplikationen

Die Inzidenz der Leberzirrhose beträgt in Europa und den USA etwa 250/100.000/Jahr; weltweit ist sie die 11-häufigste Todesursache (Van Erpecum et al., 2006).

Ursächlich für die Leberzirrhose ist bei den meisten Patienten der Alkoholabusus (ca. 60 % in Europa und den USA), gefolgt von den Virushepatitiden B und C. Andere seltenere Ursachen sind unter anderem die Autoimmunhepatitis, die primär biliäre Zirrhose, die primär sklerosierende Cholangitis, medikamenteninduzierte Leberschäden oder angeborene Stoffwechselerkrankungen. Der Anteil kryptogener Leberzirrhosen ist durch die verbesserten diagnostischen Methoden gesunken.

Bei der Leberzirrhose kommt es zu einem Parenchymbau mit einer Veränderung der Gefäßarchitektur der Leber und zur portalen Hypertension.

Die Folgen sind unter anderem eine verminderte Syntheseleistung und Exkretionsleitung der Leber und die Ausbildung von Gefäßkollateralen. Daraus resultierende Komplikationen sind die hepatische Enzephalopathie, das Auftreten von Aszites und einer Spontan bakteriellen Peritonitis (SBP) oder die Varizenblutung.

Eine Einteilung in verschiedene Schweregrade der Zirrhose erfolgt anhand des Child-Pugh-Score oder des MELD-Score (Model for End-stage Liver Disease). Der Child-Pugh-Score berechnet sich anhand folgender Parameter: Enzephalopathiegrad, Aszitesmenge, Quickwert, Bilirubin und Albumin im Serum. Kriterien für die Ermittlung des MELD-Scores sind Bilirubin im Serum, Kreatinin im Serum und die INR (International Normalized Ratio).

Portale Hypertension

Die Durchblutung der Leber beträgt etwa 25 % des Herzzeitvolumens, wobei 2/3 der Durchblutung über die Pfortader und 1/3 über die Arteria hepatica erfolgen.

Der Druck in der Pfortader beträgt beim gesunden Menschen etwa 4 mmHg, dieser steigt bei der Leberzirrhose deutlich auf Werte über 12 mmHg an.

Man unterscheidet die prähepatische von der hepatischen und posthepatischen Hypertension. Die Leberzirrhose führt zu einer hepatischen Hypertension.

Wendet man das Ohmsche Gesetz auf die Gefäßphysiologie an, ergibt sich der Druck P in der Pfortader aus dem Produkt vom Blutfluss Q und dem Strömungs-

widerstand R ($P = Q \times R$). Somit kann die portale Hypertension, wie in Abbildung 1 dargestellt, die Folge einer Zunahme des Blutflusses im Splanchnikusgebiet, als auch einer Widerstandserhöhung im intrahepatischen Flussbett sein.

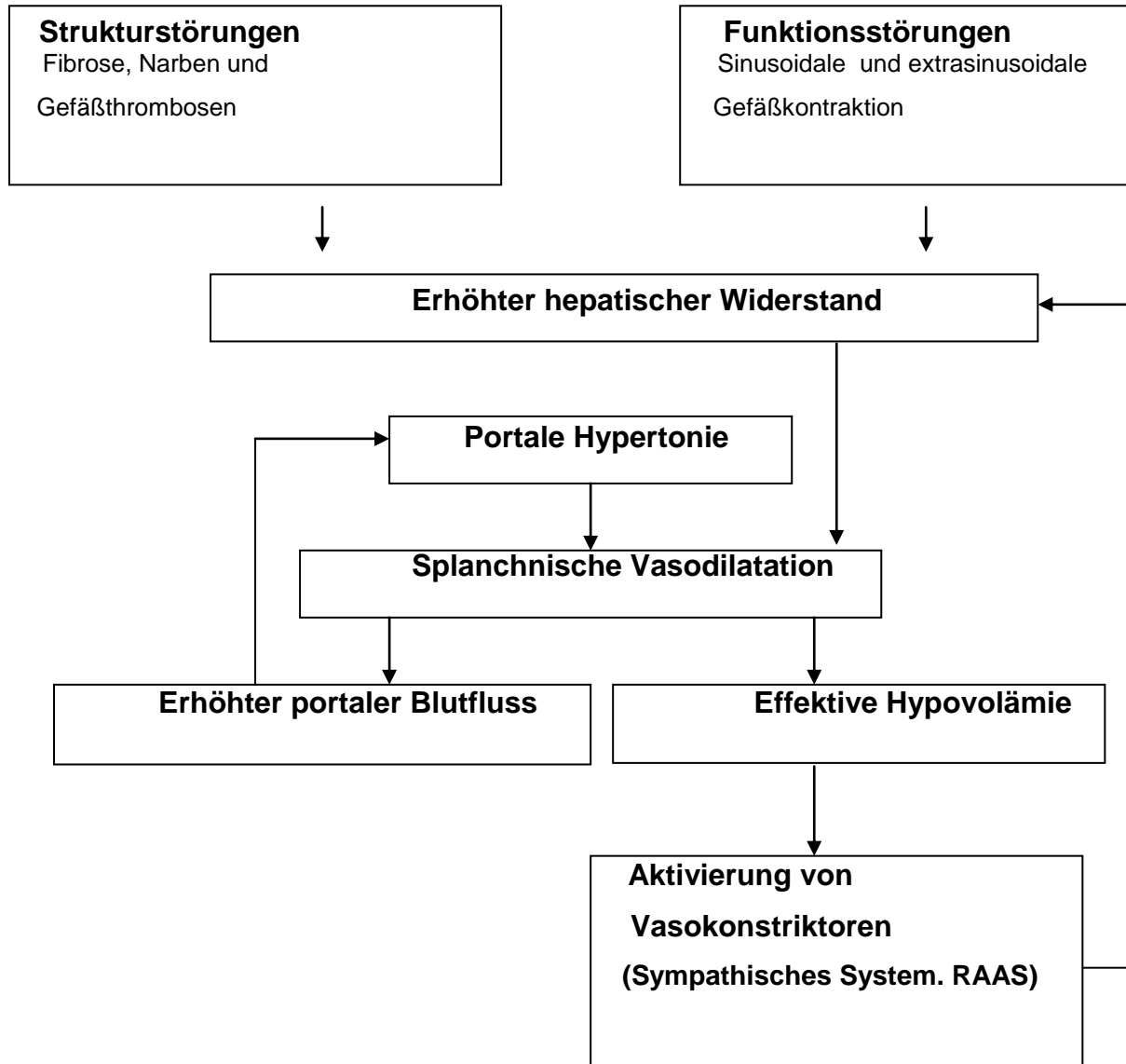


Abb. 1: In die Pathogenese der portalen Hypertension involvierte Mechanismen (aus Bosch et al., 2000; De Franchis et al., 2002)

Zu der intrahepatischen Widerstandserhöhung trägt auf der einen Seite die Einengung der Sinusoidalgefäße durch Kollagenablagerungen und Fibrosierungen bei. Auf der anderen Seite besteht auch eine dynamische Komponente mit einer gesteigerten intrahepatischen Vasokonstriktion. Vor allem im fortgeschrittenen Stadium der Leberzirrhose kommt es durch die Zunahme des Blutflusses in der Pfortader zu einem weiteren Anstieg des portalen Druckes.

Die portale Hypertension ist eine wesentliche Ursache für die Ausbildung von Varizen, darüber hinaus ist sie auch ein wesentliches Glied in der Pathophysiologie der Aszitesbildung (Bosch et al., 2000).

1.2 Grundlagen der Aszitesbildung

Die Ausbildung von Aszites ist die häufigste Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose. Sie ist ein ungünstiges prognostisches Zeichen und geht mit einer durchschnittlichen 2-Jahres-Mortalität von bis zu 50 % einher (Van Erpecum et al., 2006).

Die Pathogenese der Aszitesbildung ist immer wieder diskutiert worden. Lange bestanden zwei Theorien: die „underfilling“- und die „overflow“-Theorie.

Nach der „underfilling“-Theorie führt die portale Hypertension zu einer Vasodilatation im Splanchnikusgebiet, wahrscheinlich bedingt durch eine gesteigerte Freisetzung von vasodilatierenden Substanzen wie beispielsweise NO, Glucagon, Prostaglandinen und dem vasoaktiven intestinalen Peptid (VIP), sowie einem gestörten Ansprechen der Splanchnikusgefäße auf Vasokonstriktoren. Das daraus resultierende Blutpooling im Splanchnikusgebiet führt zu einer Verminderung des effektiven zentralen Blutvolumens mit einer Aktivierung der Barorezeptoren. Die Verminderung des intrathorakalen Blutvolumens bedingt eine Stimulation des Sympathikus, des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und führt zu einer vermehrten Sekretion von Antidiuretischem Hormon (ADH). Als Folge kommt es zu einer renalen Retention von Natrium und Wasser sowie zu einer renalen Vasokonstriktion.

Die „overflow“-Theorie dagegen stellt die vermehrte Natriumretention der Niere, bedingt durch die portale Hypertension, an den Beginn der Kaskade. Die Natriumretention führt zu einer Vergrößerung des Plasmavolumens und trägt so zur Aszitesentstehung bei (Gentilini et al., 1999).

Aus diesen beiden Theorien ist in den letzten Jahren die in Abbildung 2 dargestellte „forward“-Theorie entstanden. Diese Theorie geht davon aus, dass die Aszitesbildung vor allem eine Folge der arteriellen Vasodilatation im Splanchnikusgebiet ist, die zu zwei unterschiedlichen Ereignissen führt:

Das Erste ist ein sekundärer Anstieg der splanchnischen Mikrozirkulation. Die verstärkte Mikrozirkulation führt zu einem Anstieg des kapillären Druckes, der

kapillären Permeabilität und der Lymphbildung. Die vermehrte Lymphbildung entsteht auch durch Zirkulationsveränderungen in der Leber selbst.

Das Zweite ist ein Abfall des zentralen effektiven Blutvolumens mit daraus resultierender Aktivierung des RAAS, des sympathischen Systems sowie des ADH. Dieser Mechanismus wird auch arterielles „underfilling“ genannt und bewirkt eine verstärkte renale Natrium- und Wasserretention. Das gleichzeitige Auftreten beider Ereignisse führt zu einer kontinuierlichen Aszitesbildung (Arroyo et al., 2000).

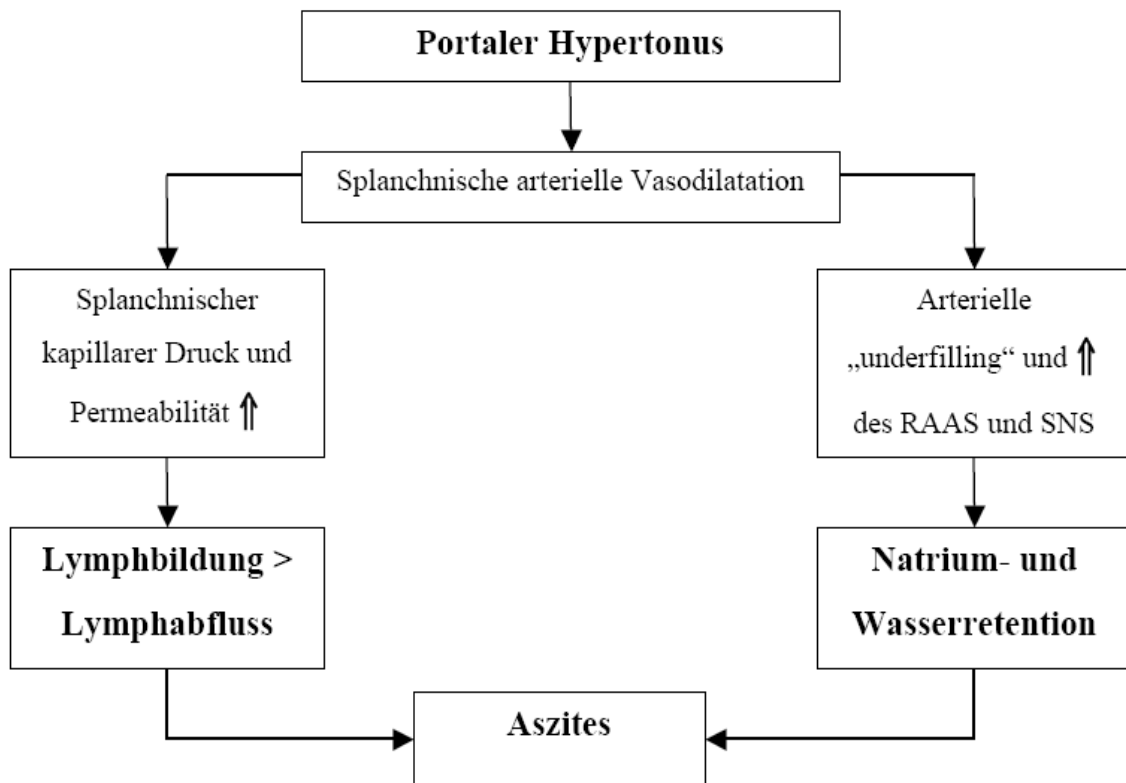


Abb. 2: Die „forward“-Theorie der Aszitesbildung (aus Arroyo et al., 2000)

1.3 Spontan bakterielle Peritonitis als Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites

1.3.1 Definition

Die Spontan bakterielle Peritonitis (SBP) ist definiert als Infektion des Aszites auf dem Boden einer Leberzirrhose ohne intestinale Läsion.

Nach dem „consensus document on spontaneous peritonitis“ ist die Erkrankung heute durch den Nachweis von Neutrophilen Graulozyten ≥ 250 / μ l mit oder ohne Keimnachweis bei fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektion definiert (Rimola et al., 2000; Runyon, 2009).

1.3.2 Inzidenz und Pathomechanismus

Die Inzidenz des Auftretens der Spontan bakteriellen Peritonitis bei stationären Patienten mit Leberzirrhose und Aszites schwankt zwischen 10 % und 30 %, wobei eine Korrelation zwischen Häufigkeit der SBP und dem Schweregrad der Leberzirrhose besteht (Caly et al., 1993; Rimola et al., 2000).

Laut einer Untersuchung, die an 40 internistischen und gastroenterologischen Krankenhausabteilungen in Deutschland durchgeführt wurde, lag die Prävalenz bei hospitalisierten Patienten im Jahr 1998 bei 14 % (Fleig et al, 2004). In der Arbeit von Fernandez et al, 2002 sogar bei 24 %.

Bei ambulanten Patienten liegt die Prävalenz bei etwa 3,5 % (Evans et al., 2003).

Als Pathomechanismus der SBP wird der Vorgang der bakteriellen Translokation von enteralen Keimen angesehen. Die bakterielle Translokation ist definiert als Passage von Darmbakterien aus dem Darmlumen in die extraluminale, mesenteriale Lymphknoten.

Bei Patienten mit Leberzirrhose kommt es zu einem vermehrten intestinalen Bakterienwachstum, einer erhöhten Durchlässigkeit der intestinalen Schleimhaut, einer verringerten Darmmotilität und einer verminderten Immunabwehr als Ursache für die vermehrte Passage der Darmbakterien nach extraluminal.

Dabei begünstigt eine bestehende portale Hypertension die Translokation (Casafont et al., 1997; Guarner et al., 1997).

Guarner et al. (1997) zeigten, dass Ratten mit Leberzirrhose ein vermehrtes intestinales Bakterienwachstum aufweisen, welches zur bakteriellen Translokation beiträgt.

Pardo et al. (2000) untersuchten 30 zirrhotische Ratten und 164 zirrhotische Patienten vor und nach der Behandlung mit Cisaprid bzw. einem Placebo. Cisaprid führt zu einer verstärkten Acetylcholinfreisetzung aus den postganglionären Nervenenden des Plexus myentericus und wirkt so prokinetisch. Unter Cisaprid kam es zu einer signifikanten Verringerung des intestinalen Bakterienwachstums. Man nimmt daher an, dass eine verringerte Darmmotilität bakterielles Wachstum begünstigt. Weiterhin zeigte sich, dass mit der Reduktion des intestinalen Bakterienwachstums eine verringerte bakterielle Translokation assoziiert ist.

Guarner et al. (1997), Runyon et al. (1994) und Llovet et al. (1998) zeigten in tierexperimentellen Studien, dass es durch eine wiederholte bakterielle Translokation aus dem intestinalen Lumen in das Peritoneum über mesenteriale Lymphknoten zu einer bakteriellen Besiedlung auch der Aszitesflüssigkeit kommt.

Llovet et al. (1998) und Runyon et al. (1994) fanden außerdem bei 25 % der Ratten mit bakterieller Translokation Bakterien im Blut, während keine der Ratten ohne bakterielle Translokation eine Bakteriämie aufwies.

Llovet et al. (1998) konnten außerdem zeigen, dass es sich bei der im intestinalen Lumen, im Peritoneum, im venösen Blut und den mesenterialen Lymphknoten nachweisbaren bakteriellen DNA um identische Sequenzen handelt.

Zusammenfassend spielt die bakterielle Translokation eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der SBP. Casafont et al. (1997) unterstützen durch ihre tierexperimentelle Studie diese Aussage: Sie wiesen bei 100 % der untersuchten Ratten mit SBP eine bakterielle Translokation nach. Bei den Tieren mit sterilem Aszites konnte dagegen nur bei 57 % eine bakterielle Translokation nachgewiesen werden.

1.3.3 Prognose

Das Auftreten einer SBP verschlechtert die Prognose der Patienten mit Aszites. Die Mortalität einer Episode (30Tage-Überleben) beträgt in verschiedenen Studien trotz adäquater Antibiotikatherapie zwischen 10 % und 40 % (Hoefs et al., 1985; Pelletier et al., 1990; Cho et al., 2007). Das Ein-Jahres-Überleben beträgt 30-50 % (Rimola et al., 2000; Musskopf et al., 2012).

1.3.4 Historischer Überblick über unterschiedliche Definitionskriterien der Spontan bakteriellen Peritonitis

In der Literatur der vergangenen 25 Jahre finden sich unterschiedliche Diagnosekriterien für eine SBP.

Ursprünglich wurde der Bakteriennachweis im Aszites ohne Nachweis für eine abdominelle Infektionsquelle als obligat für die Diagnose einer SBP angesehen (Runyon et al., 1988).

Aufgrund der geringen Sensitivität der Bakterienkultur und des großen Zeitintervalls bis zum Bakteriennachweis durch die Kultur, wurde immer wieder nach anderen Faktoren gesucht, die eine schnellere Diagnose und damit eine schnellere Therapieeinleitung ermöglichen.

Hoefs et al. definierten schon 1982 eine SBP nicht nur durch den positiven Bakteriennachweis, sondern auch durch eine Neutrophilenkonzentration $\geq 250 /\mu\text{l}$.

1986 empfahlen Stassen et al. einen pH-Wert $\leq 7,34$ oder einen Blut-Aszites-pH-Gradienten $\geq 0,1$ jeweils in Verbindung mit einer Gesamtzellzahl $\geq 500 /\mu\text{l}$ als sofortige Diagnosekriterien für eine SBP.

Bereits im Jahr 1984 beschrieben Runyon et al. den „Neutrozytischen Aszites“, auch „CNNA“ (culture-negative neutrocytic ascites) genannt, als eine Variante der Spontan bakteriellen Peritonitis.

Dieser zeichnet sich durch eine Neutrophilenkonzentration $\geq 500 /\mu\text{l}$ bei fehlendem Keimnachweis aus. Die Bezeichnung „CNNA“ wurde 1990 von Pelletier et al. aufgegriffen. Im Unterschied zu Runyon et al. definierten sie den neutrozytischen Aszites als Aszites mit einer Neutrophilenkonzentration $\geq 250 /\mu\text{l}$ bei fehlendem Keimnachweis. Dies entspricht der heutigen Definition.

Im selben Jahr beschrieben Runyon et al. den „Bakteraszites“: Aszites mit positivem Keimnachweis ohne erhöhte Neutrophilenzahl.

Die Definition des Bakteraszites gilt auch heute.

Bis zum Erscheinen des „consensus document on spontaneous peritonitis“ des International Ascites Clubs im Jahr 2000 fanden sich jedoch immer wieder andere Definitionen.

Andreu et al. (1993) definierten in einer Studie zu Risikofaktoren einer Spontan bakteriellen Peritonitis eine SBP wie folgt: (1) ein Keimnachweis im Aszites oder im Blut und eine Neutrophilenkonzentration $\geq 250 /\mu\text{l}$ im Aszites bei (2) fehlendem

Hinweis auf eine abdominelle Infektionsquelle und bei fehlendem Keimnachweis im Aszites (3) eine Neutrophilenkonzentration ≥ 500 / μ l im Aszites.

Zusammenfassend ist die SBP heute nach den Konsensusempfehlungen durch den Nachweis von Neutrophilen Granulozyten ≥ 250 / μ l mit oder ohne Keimnachweis bei fehlendem Hinweis auf eine abdominelle Infektion definiert (Rimola et al., 2000).

Der Bakteraszites, der den Aszites mit positivem Keimnachweis ohne erhöhte Neutrophilenzahl bezeichnet, gilt nach den aktuellen deutschen Konsensusbestimmungen nicht als SBP (Gerbes et al., 2001). Diese Definitionen werden auch in dieser Arbeit verwendet.

1.3.5 Klinische Zeichen einer Spontan bakteriellen Peritonitis

Begleitend zur SBP können Symptome und klinische Zeichen auftreten, die jedoch nicht als spezifisch angesehen werden können. Als typische klinische Befunde sind Fieber, abdominelle Schmerzen oder eine allgemeine Verschlechterung des Zustandes (Conte et al., 1993), aber auch die Verschlechterung der Nierenfunktion oder das Auftreten beziehungsweise der progrediente Verlauf einer Hepatischen Enzephalopathie zu nennen.

Für eine Diagnosestellung sind diese Symptome jedoch zu unspezifisch.

1.4 **Diagnostische Untersuchung des Aszites**

1.4.1 Aszites Parazentese und Zelldifferenzierung

Der sichere Nachweis einer SBP gelingt nur durch eine Aszitesparazentese mit nachfolgender Untersuchung des Aszites.

Die internationalen Konsensusempfehlungen sehen eine diagnostische Parazentese zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme sowie bei lokalen Zeichen einer Peritonitis, systemischen Zeichen einer Infektion, einer hepatischen Enzephalopathie oder einer rapiden renalen Verschlechterung ohne offensichtliche Ursache (Rimola et al., 2000; Runyon, 2009).

Die Parazentese ist einfach und sicher durchzuführen. Komplikationen wie zum Beispiel Bauchhauthämatome treten mit einer Häufigkeit von 1 % nur sehr selten auf (Runyon et al., 2004).

Die Diagnose einer SBP gilt als gesichert, wenn der Goldstandard von 250 Neutrophilen Granulozyten pro μ l im Aszites erfüllt ist.

Eine maschinelle Differenzierung und Quantifizierung der Granulozyten ist technisch schwierig und verlangt spezielle Geräte.

Ebenfalls gebräuchlich ist die maschinelle Bestimmung der Leukozytenzahl, hierbei geht man ab einer Konzentration von größer 500 Leukozyten pro μL von einer SBP aus.

1.4.2 Beimpfung von Bakterienkulturflaschen mit Aszites zur Diagnose der SBP

Die Diagnostik des Aszites beinhaltet als grundlegende Untersuchung nicht nur die Bestimmung der Zellzahl, sondern auch die Beimpfung von Bakterienkulturflaschen mit Aszitespunktat. Das positive Ergebnis der Bakterienkultur beweist zum einen die bakterielle Besiedlung des Aszites und gibt Hinweise auf eine eventuell vorliegende Infektion, zum anderen kann nach angelegtem Antibiotogramm gezielt antibiotisch therapiert werden. In prospektiv angelegten Studien konnte gezeigt werden, dass es zu einer höheren Sensitivität der Bakterienkultur kommt, wenn die Kulturflaschen direkt am Bett des Patienten beimpft werden (Runyon et al., 1988). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass die Beimpfung mit 10 mL Punktat die meisten positiven Ergebnisse ergibt (Castellote et al., 1990; Fernandez et al., 2002).

Allerdings liegen unter Anwendung dieser Methoden trotzdem häufig negative Kulturergebnisse vor. Nur bei 36 % bis 59 % der Patienten mit einer SBP nach dem Goldstandard kann eine bakterielle Besiedlung durch die Bakterienkultur nachgewiesen werden (Canete et al., 2007; Fleig et al., 2004; Thévenot et al., 2004).

Ursächlich für die niedrige Zahl positiver Kulturergebnisse ist wahrscheinlich die geringe Konzentration von Bakterien in der Aszitesflüssigkeit, im Gegensatz zu anderen Körperflüssigkeiten wie z.B. im Urin (Bobadilla et al., 1989).

Die häufigsten nachgewiesenen Erreger sind *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und Pneumokokken (Chu et al., 1995; Llovet et al., 1997; Mowat et al., 2001; Runyon et al., 1988).

In den letzten Jahren wurde ein Anstieg des Anteils grampositiver Erreger bemerkt (Almeida et al., 2007). Insbesondere *Staphylokokkus aureus* scheint eine immer größere Rolle zu spielen. In der Studie von Piroth et al. (2014) zeigte sich ebenfalls ein Anstieg der grampositiven Erreger. Im untersuchten Kollektiv waren grampositive Kokken sogar führend als Auslöser einer SBP. Bislang gibt es jedoch

keine größere Studie, die diese Hinweise für den deutschsprachigen Raum bestätigen.

Tabelle 1 zeigt die nachgewiesenen Erreger mit ihren Häufigkeiten in einer Studie von Llovet et al. von 1997.

Gramnegative Bakterien:	n=86	Grampositive Bakterien:	n=26
E. coli	41	Streptococcus pneumoniae	11
Klebsiella pneumoniae	4	Enterococcus spp.	1
Salmonella spp.	3	Andere Streptokokken	10
Pseudomona aeruginosa	2	Staphylococcus aureus	3
Klebsiella oxytoca	2	Listeria monocytogenes	1
Citrobacter freundii	1		
Enterobacter aerogenes	1		
Proteus mirabilis	1		
Morganella morganii	1		
Aeromona sobria	1		
Pasteurella	1		

Tab. 1: Verteilung der Bakterienspezies bei SBP (aus Llovet et al., 1997)

1.4.3 Prädiktive Faktoren für das Auftreten einer Spontan bakteriellen Peritonitis

Mit dem Ziel, die Diagnose einer SBP schneller stellen zu können, bzw. prädiktive Faktoren für das Auftreten einer SBP zu finden, wurden in mehreren Studien weitere Parameter untersucht.

Runyon et al. (1986) zeigten, dass ein Eiweißgehalt ≤ 1 g/dl im Aszites einen Risikofaktor für das Auftreten einer SBP darstellt. Von 47 Patienten mit initial sterilem Aszites und einem Eiweißgehalt von ≤ 1 g/dl entwickelten 15 % im Verlauf eine SBP. Im Vergleich dazu entwickelten nur 1,5 % der 65 Patienten mit einem Eiweißgehalt im Aszites > 1 g/dl eine SBP. Außerdem stellten sie fest, dass der Eiweißgehalt im Aszites konstant bleibt, sich also während und im Anschluss an eine SBP nicht signifikant ändert (Runyon et al., 1985).

Die Arbeitsgruppe zeigte darüber hinaus, dass ein niedriges Gesamteiweiß im Aszites mit einer geringeren Opsonierungsfähigkeit korreliert. Daraus folge wiederum die höhere Inzidenz einer SBP bei Patienten mit niedrigem Gesamteiweiß im Aszites (Runyon et al., 1986).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Andreu et al. (1993). Neben einem Gesamteiweiß ≤ 1 g/dl korrelierte in ihrer Studie auch ein Bilirubinspiegel von größer 2,5 mg/dl im Serum mit der Entwicklung einer SBP (n=110). SBP war in dieser

Studie wie folgt definiert: Neutrophilenkonzentration im Aszites $> 250 /\mu\text{L}$ und Keimnachweis im Aszites und/oder Blut oder Neutrophilenkonzentration $> 500 /\mu\text{L}$.

Guarner et al. (1999) sahen einen Gesamteiweißspiegel im Aszites $\leq 1 \text{ g/dl}$, einen Bilirubingehalt im Serum $> 3,2 \text{ mg/dl}$ und/ oder eine Thrombozytenkonzentration $< 98000 /\mu\text{L}$ als Risikofaktoren für eine SBP nach Goldstandard an ($n=109$).

In einer neueren Longitudinalstudie von Canete et al. (2007) stellte eine Eiweißkonzentration $< 1 \text{ g/dl}$ den einzigen unabhängigen prädiktiven Faktor für das Entstehen einer SBP dar ($n=263$).

Neuere Arbeiten beschäftigen sich mit dem Zusammenhang genetischer Polymorphismen und dem Risiko für das Auftreten einer SBP. Es konnten bestimmte Polymorphismen im TLR-2 Gen mit einem erhöhten Risiko für eine SBP in Zusammenhang gebracht werden (Nischalke et al., 2011).

1.4.4 Faktoren, die mit einer Spontan bakteriellen Peritonitis assoziiert sind

Runyon et al. (1985) untersuchten 22 Patienten vor, während und nach dem Auftreten einer SBP (definiert durch die Kombination aus Keimnachweis und einer Anzahl Neutrophiler Granulozyten $\geq 250 /\mu\text{L}$). Dabei zeigte sich ein signifikanter Abfall des Aszites/Serum Glukose Quotienten sowie ein signifikanter Anstieg des LDH-Spiegels im Aszites. Ihre Ergebnisse erklärten sie damit, dass Granulozyten Glukose verbrauchen, so dass die Glukosekonzentration bei erhöhter Granulozytenzahl abnehme.

LDH werde durch die Lyse von Granulozyten freigesetzt, so dass der LDH-Spiegel bei erhöhter Granulozytenzahl ansteige.

Albillos et al. (1990) zeigten, dass ein niedriger pH-Wert im Aszites und ein hoher Laktat-Wert im Aszites mit einem positiven Bakteriennachweis korrelieren.

In einer Studie, die Stassen et al. (1986) zur Diagnostik der SBP durchführten, ergab ein pH-Wert im Aszites $\leq 7,5$ oder ein Blut-Aszites-pH-Gradient von mindestens 0,10 in Kombination mit einer Gesamtzellzahl im Aszites ≥ 500 Zellen pro μL eine Sensitivität von 89 % bei einer Spezifität von 100 % ($n=60$).

Diese Studien beruhen jedoch nicht auf der heutigen Definition einer SBP und lassen sich daher nicht ohne weiteres auf die heutige Situation übertragen.

Eine neuere, multizentrische Studie von Noursbaum et al. (2007a), die an 1041 Patienten mit der Frage nach Risikofaktoren für das Auftreten einer SBP durchgeführt wurde zeigte, dass der Bilirubin- und der Kreatiningehalt im Serum, eine Körpertemperatur $< 36,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $> 38 \text{ }^{\circ}\text{C}$, abdominelle Schmerzen, Schüttelfrost, Enzephalopathie, akutes Nierenversagen und der Child-Pugh-Score Faktoren sind, die in der univariaten Analyse mit dem Auftreten einer SBP korrelieren. In der multivariaten Analyse ergaben sich drei unabhängige Faktoren, die mit einer SBP assoziiert waren: abdominelle Schmerzen, Hypo- oder Hyperthermie und eine Child-Pugh-Score Stadium C.

1.5 Die Bedeutung des NOD2 Proteins in der angeborenen Immunabwehr des Darmes

1.5.1 Die Familie der (NOD) - like Rezeptor Proteine

NOD2 (nuclear oligomerization domain 2) gehört zur Gruppe der NLR Proteine, dabei steht NLR für nod-like receptor Proteine. Allen Vertretern dieser Gruppe ist das Vorhandensein von leucin rich repeats gemeinsam, repetitive Motive aus der Aminosäure Leucin. Auf die Funktion dieser Eigenschaft wird im weiteren eingegangen.

NOD2 wird durch das CARD15 Gen (caspase recruitment domain) kodiert und ist ein im Zytosol lokalisiertes Protein, welches eine zentrale Rolle in der Erkennung bakterieller Zellwandbestandteile einnimmt und somit eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunantwort spielt. Exprimiert wird es im gesamten Colon.

Es liegt in epithelialen Zellen auch membranassoziiert vor, diese Assoziation zur Zellmembran ist wahrscheinlich entscheidend für die weitere Signaltransduktion und die Aktivierung von NF-kappa B, einem wichtigen Induktor der angeborenen Immunität (Barnich et al., 2005).

1.5.2 Die Struktur des NOD2 Proteins

Das NOD2 Protein besteht, wie alle Mitglieder der NLR Familie, im wesentlichen aus drei strukturellen Einheiten.

1. Die Carboxy (C)- terminale LRR Region

Diese zeichnet sich durch den hohen Gehalt an der Aminosäure Leucin aus und bildet eine schleifenartige Struktur (loop), welche der Erkennung von bakteriellen

Zellwandbestandteilen dient. Ein solches Strukturelement findet sich auch bei Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die membrangebunden auf der Zelloberfläche oder auf Endosomen vorkommen (siehe Abbildung 3).

2. Die zentrale NOD Region

NOD steht hierbei für nuclear oligomerization domain. Durch dieses Strukturelement ist eine Oligomerisation des NOD2 Proteins möglich. Außerdem besitzt diese Region auch eine ATPase Aktivität.

3. Die Amino (N)- terminale CARD Region

Die Abkürzung CARD steht für caspase-recruitment domain und ist die Region des Proteins, die Protein-Protein Interaktionen vermittelt und somit entscheidend für die weitere Signaltransduktion ist. NOD2 hat im Gegensatz zu NOD1 zwei N-terminale CARD Regionen.

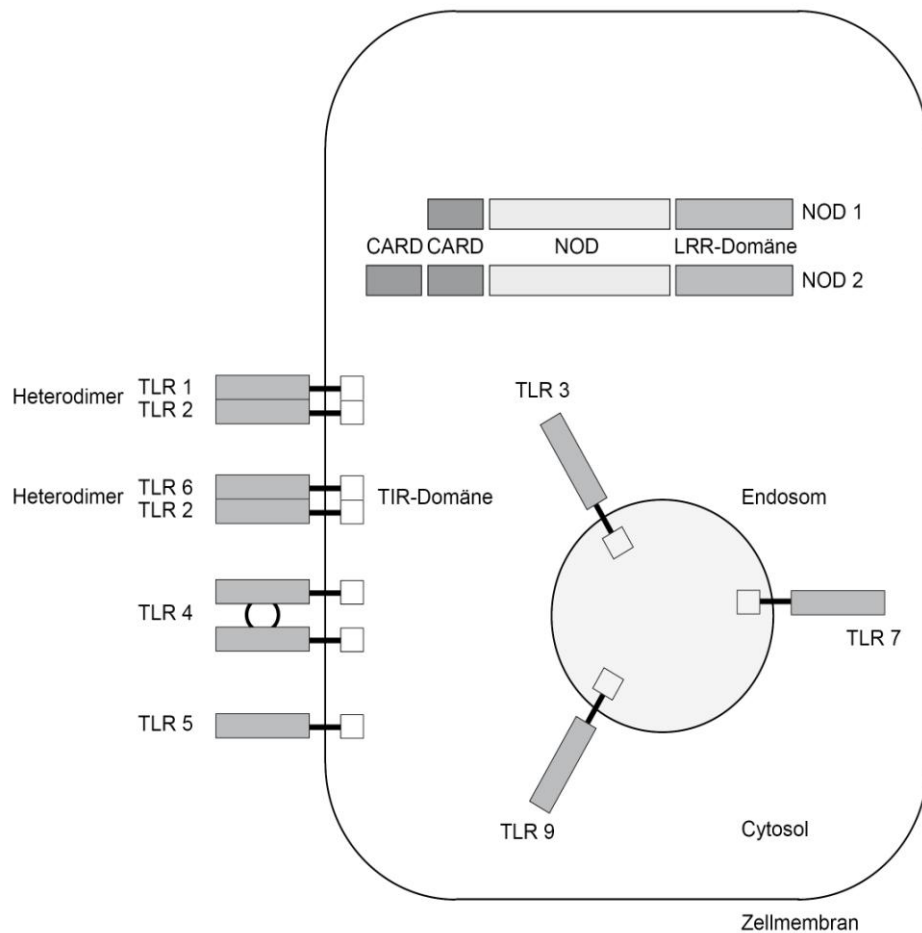


Abb. 3: Lokalisation von NOD Proteinen und toll-like-Rezeptoren in der Zelle

1.5.3 Genexpression von Card15/NOD2

NOD2 wird hauptsächlich von zwei Zellspezies exprimiert: von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und epithelialen Zellen.

Das NOD2 Protein wird in Darmepithelien normalerweise nur mäßig stark exprimiert (Hisamatsu et al., 2003). Durch proinflammatorische Stimuli, wie zum Beispiel TNF α , wird NOD2 verstärkt exprimiert, was einen Hinweis auf die Rolle dieses Proteins bei entzündlichen Darmerkrankungen gibt (Rosenstiel et al., 2003). Diese Regulation des CARD15 Gens wird über NF- κ B Bindungsstellen in der Promotorregion des Gens vermittelt. Im Verlauf führt dies zu einer positiven Rückkopplung, da NOD2 wiederum NF- κ B aktiviert.

Die Erkenntnisse über diese Regulationsmechanismen basieren auf oben genannten Studien an Darmepithelzelllinien.

In Paneth Zellen wird NOD2 auch unter normalen Bedingungen stark exprimiert, was eine Rolle bei der Produktion von α -Defensinen spielen soll (Ogura et al., 2003).

Einige Studien konnten zeigen, dass die Paneth-Zellen bei Patienten mit genannten NOD2 Mutationen weniger α -Defensine sezernieren (Wehkamp et al., 2004).

Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass die geringere mukosale Konzentration von α -Defensinen bei Patienten mit Morbus Crohn und NOD2 Mutationen nur auf einem Rückgang der Paneth-Zellen selbst beruht und somit durch die entzündliche Reaktion bedingt ist (Simms et al., 2008). Welche Rolle die beschriebenen NOD2 Polymorphismen bei der Produktion von α -Defensinen und der Regulation der Paneth-Zellen genau spielen, bedarf noch weiterer Erforschung.

1.5.4 Intrazelluläre Signaltransduktion des NOD2 Weges

Das NOD2 Protein kann über die bereits beschriebene LRR-Region eine Reihe bakterieller Zellwandbestandteile binden. Dies führt letztlich zu einer Aktivierung von NF- κ B einem Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, daher ist das NOD2 Protein ein zentraler Faktor in der Induktion einer Immunantwort. Die genauen Abläufe dieser Signalkaskade und auch einiger Nebenwege, die für die Immunabwehr wesentlich erscheinen, sollen im Folgenden dargestellt werden.

Bisher ist beschrieben, dass NOD2 durch Muramyl Dipeptide (MDP) aktiviert werden kann (Girardin et al., 2003). MDP ist Bestandteil des Peptidoglykangerüsts

sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien. Freigesetzt wird MDP wahrscheinlich durch endolysosomale Verdauung von Bakterien oder Bakterienbestandteilen durch Antigen präsentierende Zellen. In epithelialen Zellen spielt anscheinend die Aufnahme von luminalem Muramyl-dipeptid (MDP), einem Bestandteil bakterieller Zellwände, über einen aktiven Transportmechanismus eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass MDP ein Ligand des humanen Peptidtransporters (hPepT1) ist (Vavricka et al., 2004).

hPepT1 ist ein ein apikaler Di- und Tripeptidtransporter, der im Symport mit H⁺-Ionen ein großes Spektrum an Substraten aufweist, die in ihrer Größe stark variieren können. Der genannte Transporter spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Di- und Tripeptiden aus der Nahrung, sowie einiger Medikamente (Adibi, 1997). Normalerweise wird hPepT1 im Dünndarm, nicht jedoch in Ösophagus, Magen und Dickdarm exprimiert. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie Morbus Crohn ist hPepT1 mRNA auch in Dickdarmepithel nachweisbar (Merlin et al., 2001). Daher ist zu vermuten, dass diesem induzierbaren Peptidtransporter eine Rolle in der Immunantwort zukommt.

Ein weiterer wichtiger Weg zur Aufnahme von MDP in die Zellen scheint über Endosomen abzulaufen, dabei spielen die endolysosomalen Peptidtransporter SLC15A3 und SLC15A4 eine entscheidende Rolle für die Freigabe von MDP in der Zelle (Nakamura et al., 2014). Die Expression dieser Transporter ist speziell in dendritischen Zellen nachgewiesen und kann ebenfalls durch inflammatorische Prozesse gesteigert werden.

Durch Bindung von MDP an die LRR Region von NOD2 kommt es zu einer komplexen Strukturänderung des Proteins und in der Folge zu einer ATP abhängigen Selbst-Oligomerization. Dadurch kann die Serin-Threonin Kinase RICK aktiviert werden, welche die Polyubiquitylierung der I κ B-Kinase- γ einem Bestandteil des IKK-Komplexes induziert. Dieser Komplex ist ein Inhibitor von NF- κ B und wird durch die Ubiquitylierung ausgeschaltet.

Dadurch unterliegt der NF- κ B Komplex keiner Hemmung mehr und Bestandteile können als Transkriptionsfaktoren aktiv werden (siehe Abbildung 4).

Des Weiteren sei erwähnt, dass weitere Signalkaskaden angenommen werden, die unabhängig von NF- κ B sind. Darunter die p38MAP-Kinase (mitogen-activated protein Kinase) und ERK (extracellular-signal-regulated Kinase).

Außerdem ist bekannt, dass Proteine aus der Gruppe der NLR untereinander Verbindungen über die NOD beziehungsweise CARD Regionen eingehen können und zwar als NOD-NOD oder CARD-CARD Interaktionen. Diese Interaktionen könnten eine Rolle für einen Funktionsverlust mutierter NOD2 Varianten spielen und finden sich daher auch in den später diskutierten Theorien wieder.

Ein Beispiel für eine solche Interaktion ist die Bindung von CARD12 an NOD2 durch NOD-NOD Interaktion und die daraus folgende verminderte Aktivierung von NF- κ B.

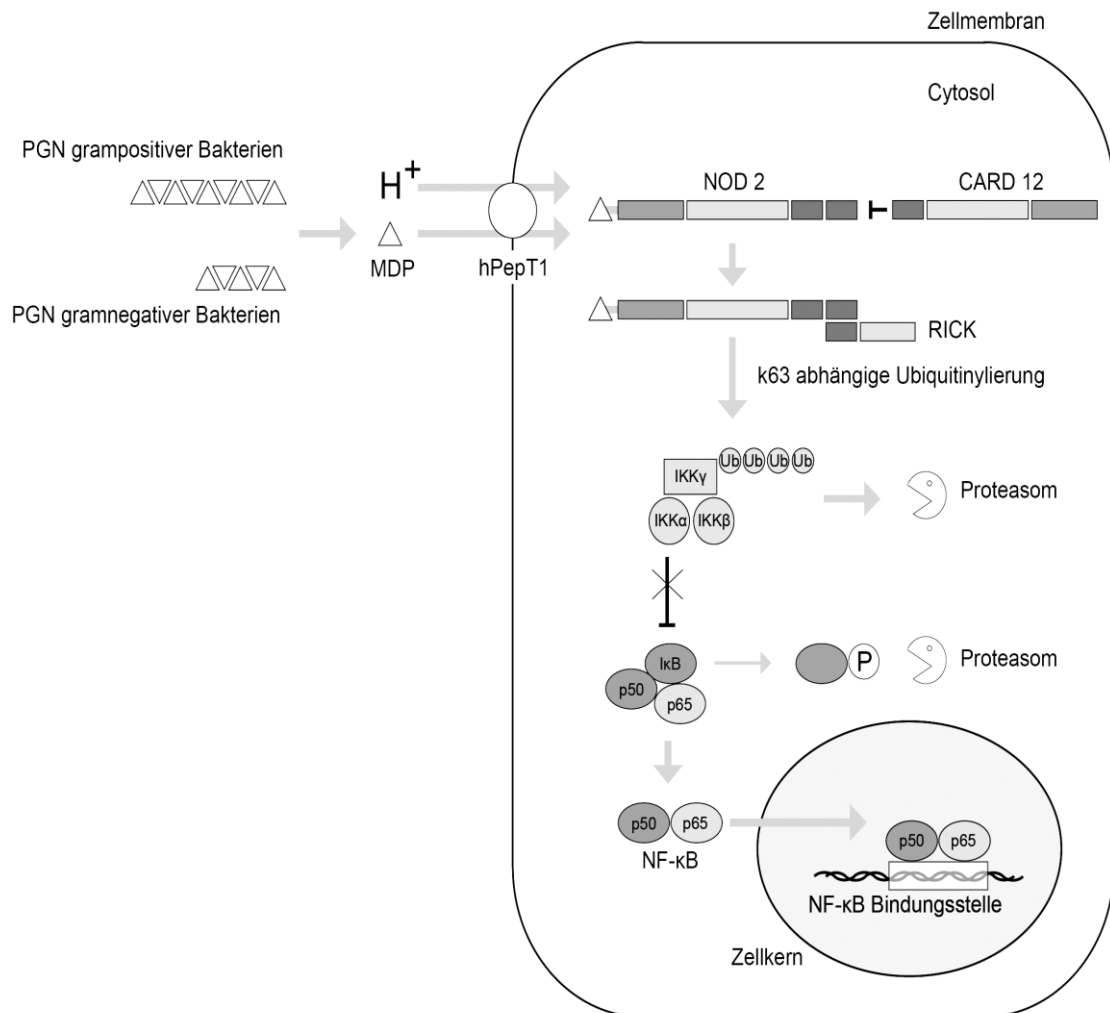


Abb. 4: Signaltransduktion des NOD2 Weges

1.5.5 Assoziation von NOD2 Polymorphismen zu verschiedenen Syndromen und Erkrankungen

Auf Grund der im Vorfeld beschriebenen Rolle des NOD2 Proteins für die Erkennung bakterieller Bestandteile und die daraus folgende Induktion proinflammatorischer Zytokine oder der verminderten Sezernierung von α -Defensinen, ist es nicht sonderlich verwunderlich, dass einige genetische Polymorphismen des CARD15 Gens beschrieben werden konnten, welche mit einem erhöhten Risiko für verschiedene Krankheiten assoziiert sind. Einige Beispiele werden im Verlauf dieser Arbeit erläutert und Erklärungsmodelle für den zu Grunde liegenden Pathomechanismus diskutiert.

Veränderungen im CARD15 Gen konnten bislang in Zusammenhang gebracht werden mit dem Blau Syndrom, einer granulomatösen Erkrankung mit Befall von Haut und Gelenken, der early onset sarcoidosis, außerdem gelten sie als Risikofaktor für Graft-versus-host Erkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang mit dem Auftreten eines Morbus Crohn gibt. Dabei konnten bislang drei Polymorphismen beschrieben werden, die mit einem erhöhten Risiko für Morbus Crohn assoziiert sind. Diese werden als SNP8, SNP12 und SNP13 bezeichnet. SNP steht für single nucleotide polymorphism und bezeichnet somit das Fehlen oder den Austausch einer einzigen Base mit der Folge einer Veränderung des Leserasters der DNA oder dem Austausch einer Aminosäure im späteren Protein (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001; Hoefkens et al., 2013).

Diese Polymorphismen werden auch im weiteren Gegenstand dieser Arbeit sein.

Bei SNP8 befindet sich die Veränderung in Exon 3 die Base Cytosin ist durch Thymin ersetzt. Diese Mutation liegt kurz vor der LRR Region. Bei SNP12 ist in Exon 7 Guanin durch Cytosin ersetzt, die Mutation liegt innerhalb der LRR Region. Bei SNP13 findet sich in Exon 10 eine Insertion von Cytosin, dies führt zu einem Stoppcodon im Bereich der LRR Region, wodurch diese für die Bindung von MDP entscheidende Region verkürzt ist. Die genauen Ortsangaben sind:

SNP8 Exon 3 2023C > T; SNP12 Exon 7 2641G > C; SNP13 Exon10 2936insC.

Diese Polymorphismen finden sich bei 10-15 % der Patienten mit Morbus Crohn und bei weniger als 10 % der Normalbevölkerung in Westeuropa, allerdings mit großen ethnischen Unterschieden (Bareiro-de-Acosta et al., 2010). Die Inzidenz für Morbus

Crohn unterliegt in Europa einem Nord-Süd Gefälle, diejenige für die genannten Polymorphismen eher einem Süd-Nord Gefälle, so dass eine solch starke Assoziation zwischen Genotyp und Phänotyp nicht in allen Ländern gegeben ist, was die multifaktorielle Genese des Morbus Crohn unterstreicht (Cavanaugh, 2006).

Die pathophysiologischen Auswirkungen dieser Veränderungen sind abschließend noch nicht geklärt. Es spricht viel dafür, dass es zu einem zumindest teilweisen Funktionsverlust kommt, es sich also um eine sogenannte „loss of function“ Mutation handelt. Diese Annahme wird schon allein dadurch bestärkt, dass sich alle drei SNPs innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der LRR Region befinden. Allerdings gibt es auch Beobachtungen, die dieser Hypothese widersprechen. Das hat dazu geführt, dass es momentan drei Erklärungsmodelle für die Rolle der SNP bei der Schwächung der Darmbarriere und letztlich dem Auftreten von Morbus Crohn gibt.

Die erste Theorie beruht auf der Entdeckung, dass NOD2 die Bildung von IL12 hemmen kann, welches durch die Bindung bakterieller Bestandteile an den TLR2 induziert wird. Der Verlust der NOD2 Funktion führt somit zu einer Enthemmung des TLR2/IL12 Weges und zu einer Schädigung des Darmepithels über die Aktivierung von (autoreaktiven) Th1-Zellen.

Die zweite Theorie geht von einer bakteriellen Fehl- und Überbesiedlung des Darmepithels aus. Dabei ist in den Epithelzellen die Aktivierung von NF- κ B gestört und somit entsteht ein zentraler Defekt in der angeborenen Immunität. In diesem Modell spielt die dann verminderte Produktion von α -Defensinen durch Paneth-Zellen eine entscheidende Rolle. α -Defensine spielen bei der Abwehr verschiedener Bakterien eine Rolle, so zum Beispiel *Lysteria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, aber auch bei *Candida albicans* (Wehkamp et al., 2009).

Diese Theorie widerspricht damit nicht grundlegend der ersten Theorie, da eine solche bakterielle Überbesiedlung natürlich auch zur Sezernierung von IL12 und einer verstärkten Th1- Antwort führen kann.

Die dritte Theorie beruht auf Mausmodellen, bei denen die Mäuse das kranke Allel des SNP13 hatten. Diese knock-in Mäuse produzierten höhere IL-1 β Spiegel durch Makrophagen nach Stimulierung mit MDP (Maeda et al., 2005).

In diesem Modell stellt die NOD2 Veränderung also eine „gain-of-function“ Mutation dar, denn es kommt zu einer Hyperaktivierung von NF- κ B und dadurch zur gesteigerten IL-1 β Produktion.

Die besprochenen Theorien befassen sich alle mit der Rolle des NOD2 Signalweges bei Morbus Crohn und der gestörten Immunabwehr gegenüber Bakterien bei Patienten, die Träger eines der SNP sind. Diese Erkenntnisse haben zu der Überlegung geführt, dass Patienten mit einem der genannten Polymorphismen häufiger eine SBP im Rahmen ihrer Leberzirrhose entwickeln. Es ist bekannt, dass die Bakterien, die eine SBP hervorrufen, aus dem Darmlumen stammen. Sie gelangen über die mesenterialen Lymphknoten und die Blutbahn schließlich in den Aszites. Die daraus folgende Hypothese ist, dass Patienten mit einem der Polymorphismen eine geschwächte Darmbarriere haben und es häufiger zu einer bakteriellen Translokation und einer SBP kommt.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1.

Gibt es Unterschiede zwischen der Gruppe der Patienten mit und den Patienten ohne Veränderung im CARD15 Gen hinsichtlich laborchemischer Parameter in Aszites und Blut?

2.

Welche Wertigkeit haben die SNP 8, 12 und 13 im CARD15 Gen als Risikofaktoren für das Auftreten von Bakteraszites oder einer SBP?

3.

Welche Auswirkungen haben die SNP 8, 12 und 13 auf das Überleben der Patienten?

2. Patienten und Methoden

2.1 Patienten

Zwischen März 2006 und November 2007 wurden 150 stationäre Patienten mit Leberzirrhose und Aszites untersucht, die zuvor in die Medizinische Klinik der Universität Bonn aufgenommen wurden. Die Studie wurde der Ethikkommission der Universität Bonn vorab vorgelegt und das Ethikvotum mit der Nummer 254/08 erteilt.

Einschlusskriterien:

- eine Leberzirrhose
- Alter > 18 Jahre
- Nachweis von punktionswürdigem Aszites
- vorliegende Einverständniserklärung

Ausschlusskriterien:

- Alter < 18 Jahre
- fehlende Einverständniserklärung
- Kontraindikation zur Aszitespunktion: unzureichender Gerinnungsstatus

Es gab keinen Patienten, der unter die Ausschlusskriterien fiel.

Im Anschluss an das Feststellen der Einschlusskriterien und bei Vorliegen der Einverständniserklärung erfolgte die genauere Anamnese und klinische Untersuchung des Patienten. Dabei wurden folgende Parameter erfasst:

- Ursache der Leberzirrhose
- Antibiotische Therapie zum aktuellen Zeitpunkt oder um weniger als eine Woche zurückliegend
- Körpertemperatur
- Blutdruck und Herzfrequenz
- Abdomineller Druck
- Schmerzen
- Dyspnoe
- Übelkeit
- Enzephalopathie-Grad nach den Westhaven-Kriterien

Die Festlegung der klinischen Beschwerden erfolgte durch den Patienten selber, indem er den Schweregrad seines abdominellen Druckes, seiner Luftnot und seiner Übelkeit auf einer Punkteskala von 0-3 (0: gering, 3: sehr stark), seiner Schmerzen auf einer Skala von 1-10 (1: gering, 10: sehr stark) festlegte.

Der Enzephalopathie-Grad (nach den Westhaven Kriterien) wurde anhand des Zahlenverbindungstest (Number Connection Test), der zur Schweregradeinteilung der Hepatischen Enzephalopathie herangezogen wird, erfasst.

Laborchemische Parameter des Blutes:

Nach der Punktion einer peripheren Vene zur Blutentnahme unter Verwendung einer EDTA-, einer Serum- und einer Citrat-Monovette (Sarstedt, Numbrecht) erfolgte die Bestimmung der Parameter Albumin, Bilirubin, Gesamteiweiß, Kreatinin, Leukozyten, Neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, Quick-Wert und INR im Institut für Klinische Biochemie der Universitätsklinik Bonn.

Anhand der laborchemischen Parameter wurde der Leberdekompressionsgrad des jeweiligen Patienten ermittelt. Zum einen erfolgte anhand folgender Formel die Bestimmung des MELD (Model for End-Stage Liver Disease):

$$10 \times [0,975 \ln(\text{Serumkreatinin in mg/dl}) + 0,378 \ln(\text{Serumbilirubin in mg/dl}) + 1,12 \ln(\text{INR}) + 0,643]$$

Außerdem wurde aus den Parametern Albumin, Quick-Wert bzw. INR, Bilirubin, Grad der Enzephalopathie und der Aszitesmenge der Child-Pugh-Score berechnet.

2.2 Durchführung der Aszitesparazentese

Zunächst wurde sonographisch die Punktionsstelle an einem typischen Ort aufgesucht und markiert. Anschließend erfolgte die dreimalige Desinfektion mit Povidon-Iod-Lösung (Betaisodona[®]) getränkten sterilen Tupfern. Nach einer ausreichenden Wartezeit, in der das Desinfektionsmittel trocknen konnte, erfolgte die Durchführung eines Hautabstriches zum mikrobiellen Nachweis von Hautkeimen.

Anschließend erfolgte die Abnahme des Aszites nach den üblichen hygienischen Richtlinien und sterilen Bedingungen.

Zur laborchemischen Bestimmung wurden zwei EDTA-, eine Serum- und eine Glucose-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht) mit Aszitespunktat gefüllt.

2.3 Untersuchung des Punktats

2.3.1 Bestimmung von Gesamtzellzahl, Granulozyten und laborchemischen Parametern

Die maschinelle Gesamtzellzahlbestimmung und die Bestimmung der Parameter Albumin, Bilirubin, Cholesterin, Gesamteiweiß, Glucose und LDH erfolgte im Institut für Klinische Biochemie.

Die Bestimmung des Anteils Neutrophiler Granulozyten an der Gesamtzellzahl erfolgte mikroskopisch im Hämatologischen Labor der Medizinischen Klinik.

2.3.2 Zytologische Untersuchung

Die manuelle mikroskopische Zellzahlbestimmung und Zelldifferenzierung wurde im Hämatologischen Labor der Medizinischen Universitätsklinik Bonn durchgeführt.

2.3.3 Mikrobiologische Untersuchung

Die Beimpfung von drei Bakterienkulturflaschen (Bactec Plus+ Aerobic, Bactec Plus+ Anerobic und Bactec Plus+ Mycosis, Becton, Dickinson and Company, Sparks, Ireland) mit jeweils 10ml Aszites erfolgte im bedside-Verfahren.

Im unmittelbaren Anschluss an die Beimpfung erfolgte der Transport in das Institut für Mikrobiologie der Universitätsklinik Bonn. Dort wurden die Auswertung und das Erstellen eines Antibiogramms bei positivem Ergebnis durchgeführt.

2.4 Genotypisierung der Patienten

2.4.1 Gewinnung der DNA

Die DNA der Patienten wurde aus EDTA Blutproben gewonnen. Hierfür wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die Gewinnung der DNA gliedert sich dabei in die drei Schritte Lyse, Aufreinigung und Eluation.

1. Lyse:

20 µL Proteinase K, 200 µL des Lysepuffers AL und 200 µL der Blutprobe werden in ein 1,5mL Zentrifugenröhrchen pipetiert. Alles wird gut vermischt und bei 56° Celsius für 10 min inkubiert.

Danach werden 200 µL Ethanol hinzugegeben, was zur Denaturierung der Proteine führt.

2. Aufreinigung:

Die so aufgeschlossene DNA wird zur Entfernung von Proteinen und Fetten in die QIAamp Spin Column gegeben. Dieses Zentrifugenröhrchen enthält eine spezielle Membran zur Aufreinigung der DNA-Probe.

Nach 1 min Zentrifugation bei 8000 U/min wird die Flüssigkeit im Auffangröhrchen verworfen und dieses durch ein Neues ersetzt. Nun werden 500 µL des Waschpuffers AW1 hinzugegeben und erneut bei 6000 U/min für 1 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird mit dem Puffer AW2 bei 14000 U/min für drei Minuten wiederholt.

3. Eluation:

Hierfür werden 200 µL Eluationspuffers AE für 1 min mit der QIAamp Spin Column bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 1 min bei 8000 U/min in ein frisches Zentrifugationsröhrchen abzentrifugiert in dem sich nun die aufgereinigte DNA befindet.

Die Konzentration der DNA wurde mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab, Erlangen, Germany) bestimmt.

2.4.2 Detektion der Polymorphismen

Die NOD2 Genvarianten (rs2066844 [p.R702W], rs2066845 [p.G908R], rs2066847 [c.3020insC]) werden durch TaqMan-Assays mit Hilfe des 7300 realtime PCR-Systems der Firma Applied Biosystems, Norwalk, CT, USA detektiert.

Die Reaktionsansätze enthalten 20ng genomische DNA, 1× Platinum qPCR SuperMix-UDG Mastermix.

Amplifiziert wird für 10min bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C für 15s und 60°C für 60s.

Die Sequenzen der Primer sind:

p.R702W, MGB_F CTGAGTGCCAGACATCTGAGAAG, MGB_R
GCTGCGGGCCAGACA, VIC CCTGCTCTGGCGCC, FAM CTGCTCCGGCGCC;
p.G908R, MGB_F TGATCACCCAAGGCTTCAGC; MGB_R
GAACACATATCAGGTACTCACTGACAC; VIC ACTCTGTTGCGCCAGA; FAM
CTGTTGCCCCAGAAT;

c.3020insC, MGB_F CCAGGTTGTCCAATAACTGCATC; MGB_R
 CCTTACCAGACTTCCAGGATGGT; VIC TGCAGGCCCTTG; FAM
 CTGCAGGCCCTTG.

Die Ergebnisse der TaqMan-Assays werden mit Hilfe des ABI PRISM 310 Genetic Analyzers (Applied) bestimmt.

2.5 Verlaufskontrolle und Bestimmung der Überlebenszeit

Drei Monate nach der Rekrutierung des letzten Patienten wurden die Überlebenszeiten und die eventuellen Todesursachen aller Patienten erfasst. Hierzu wurden zunächst die Datenbanken der Universitätsklinik in Hinblick auf Informationen über den Krankheitsverlauf des Patienten ausgewertet. Ergab sich daraus kein Hinweis auf die Überlebensdauer des Patienten, wurden die Patienten selbst, deren Hausärzte oder Angehörige kontaktiert.

2.6 Statistik

Alle Analysen wurden mit der SPSS Version 17.0 für Windows® (Chicago, Illinois, USA) durchgeführt.

Bei der deskriptiven Auswertung werden dabei der Mittelwert, der Median sowie die Standardabweichung und die entsprechenden Perzentile für Child-Pugh Grad, MELD score; LDH, Albumin und Bilirubin jeweils im Aszites; Kreatinin, CRP, Leukozyten und INR jeweils als Blutparameter angegeben.

Die Testung auf Abhängigkeit einzelner Variablen erfolgte mittels t-Test.

Eine mögliche Assoziation zwischen den einzelnen SNP und den verschiedenen Phänotypen wurde mittels Chi²-Test unter Angabe der Odds-ratio beschrieben.

Unterschiede der Überlebenszeiträume der einzelnen Genotypen sind durch Kaplan-Meier Kurven und log-rank Test dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Zwischen April 2006 und November 2007 wurden 150 Patienten in die Studie eingeschlossen, darunter 108 Männer und 42 Frauen. Das durchschnittliche Alter bei Einschluss in die Studie betrug 57 Jahre, die Spannweite lag bei 23 bis 86 Jahren.

6 Prozent (9) der Patienten hatten zum Zeitpunkt der Punktion einen Child-Pugh-Score Grad A, 45 Prozent der Patienten (68) einen Grad B und 49 Prozent (73) einen Grad C.

Die Haupterkrankungsursache war mit 61 Prozent ein chronischer Alkoholabusus.

Die weitere Verteilung der Erkrankungsursachen kann Tabelle 2 entnommen werden.

Tab. 2: Erkrankungsursachen

Erkrankungsursache	Anzahl	Häufigkeit in Prozent
Alkohol	91	61
Kryptogen	15	10
HBV	10	7
HCV	7	5
Autoimmunhepatitis	2	1
PSC	4	3
HCC primär	1	1
Hämochromatose	3	2
PBC	1	1
AAT-Mangel	2	1
Budd Chiari	2	1
Alkohol und HBV	2	1
Alkohol und Sonstiges	3	2
Alkohol und HCV	5	3
Kardial	2	1
Gesamt	150	100

Die Häufigkeiten der einzelnen SNPs können Tabelle 3 entnommen werden. Im Patientenkollektiv sind nur Patienten enthalten, die homozygote Anlageträger für den Wildtyp oder heterozygote Anlageträger für einen der drei untersuchten Polymorphismen sind.

Tab. 3: Häufigkeiten der Genotypen 8, 12 und 13 im Studienkollektiv

		Anzahl	Häufigkeiten in Prozent
SNP gesamt	Wildtyp	113	75 %
	Heterozygot	37	25 %
SNP8	Wildtyp	131	87 %
	Heterozygot	19	13 %
SNP12	Wildtyp	140	93 %
	Heterozygot	10	7 %
SNP13	Wildtyp	142	95 %
	Heterozygot	8	5 %
Gesamt		150	100 %

3.1.1 Unterschiede zwischen den Patienten in klinischen und laborchemischen Parametern

In Tabelle 4 sind die Unterschiede zwischen Patienten ohne einander untersuchten Polymorphismen im NOD2 Gen (Wildtyp) und den Patienten, die für einen der drei untersuchten Polymorphismen (SNP 8, 12 oder 13) heterozygot sind, dargestellt. Homozygote Anlageträger waren in der untersuchten Kohorte nicht vorhanden. Dabei werden deskriptiv die Mittelwerte, der Median, sowie die Standardabweichung für die einzelnen Gruppen angegeben.

Tab. 4: Klinische und laborchemische Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne NOD2 Polymorphismus

			SNP 8, 12 und 13	
			Wildtyp	Heterozygot
Child Grad	A	Anzahl	6	3
	B	Anzahl	46	22
	C	Anzahl	61	12
MELD Score		Mittelwert (SD)	17 (8)	15 (6)
		Median (IQR)	17 (10)	15 (7)
LDH (U/l)		Mittelwert (SD)	245 (86)	236 (71)
		Median (IQR)	231 (87)	229 (102)
Albumin (g/l)		Mittelwert (SD)	27,4 (6,7)	25,9 (6,9)
		Median (IQR)	26,4 (7,6)	25,8 (10,5)
Kreatinin (mg/dl)		Mittelwert (SD)	2,9 (12,3)	1,4 (0,6)
		Median (IQR)	1,4 (0,9)	1,2 (0,9)
CRP (mg/l)		Mittelwert (SD)	28,1 (30,4)	28,8 (31,3)
		Median (IQR)	18,0 (24,5)	15,7 (27,4)
Bilirubin (mg/dl)		Mittelwert (SD)	4,6 (7,5)	3,8 (5,4)
		Median (IQR)	2,2 (3,1)	1,8 (2,6)
INR		Mittelwert (SD)	1,4 (0,6)	1,3 (0,3)
		Median (IQR)	1,3 (0,3)	1,2 (0,4)
Leukozyten (G/l)		Mittelwert (SD)	7,4 (4,0)	8,0 (5,1)
		Median (IQR)	6,4 (3,6)	7,0 (5,4)

In Tabelle 5 sind für die oben aufgeführte Auswahl die Signifikanzniveaus mit Hilfe des t-Tests angegeben. Es zeigt sich, dass es bezüglich der erfassten Merkmale keinen signifikanten Unterschied zwischen heterozygoten Anlageträgern und Patienten mit einem Wildtyp gibt.

Tab. 5: Signifikanzniveaus für ausgewählte klinische und laborchemische Parameter beider Gruppen im Vergleich

Signifikanzniveaus des Gruppenvergleiches (t-Test)	
Child Grad	p=0,350
MELD	p=0,146
LDH (U/l)	p=0,524
Albumin (g/l)	p=0,240
Kreatinin (mg/dl)	p=0,207
CRP (mg/l)	p=0,912
Bilirubin (mg/dl)	p=0,449
INR	p=0,115
Leukozyten (G/l)	p=0,536

3.1.2 Therapie mit Antibiotika in beiden Gruppen

Insgesamt erhielten 48 der 150 Patienten zum Einschlusszeitpunkt eine Therapie mit Antibiotika. In der Gruppe der Patienten mit einem Wildtyp waren es 35 der 113 Patienten (31 %). In der Gruppe der heterozygoten Anlageträger waren es 13 der 37 Patienten (35 %).

3.2 Häufigkeiten und relatives Risiko für Bakteraszites und SBP in den verschiedenen Gruppen

3.2.1 Auftreten von Bakteraszites in den verschiedenen Gruppen

In den folgenden Kreuztabellen sind die absoluten Häufigkeiten eines Bakteraszites, die Signifikanz gemessen durch den Chi²-Test, sowie das Risiko, einen Bakteraszites zu entwickeln, für die einzelnen SNP aufgeführt.

Patienten, die Anlageträger des SNP 12 sind, hatten ein signifikant höheres Risiko, einen Bakteraszites zu entwickeln (p= 0,01; OR= 5,17).

Das Vorliegen eines Bakteraszites ist hierbei ein unabhängiges Ereignis und führt nur manchmal zum Auftreten einer SBP.

Tab. 6: Häufigkeiten und Risiko eines Bakteraszites für SNP8 Allelträger und Wildtypträger retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 1,26		SNP8	
		Wildtyp	heterozygot
		Anzahl	Anzahl
Bakterienkultur	Negativ	114	16
	Positiv	17	3

Tab. 7: Häufigkeiten und Risiko eines Bakteraszites für SNP12 Allelträger und Wildtypträger retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: signifikant mit P=0,01

Odds ratio: 5,17		SNP12	
		Wildtyp	heterozygot
		Anzahl	Anzahl
Bakteraszites	Negativ	124	6
	Positiv	16	4

Tab. 8: Häufigkeiten und Risiko eines Bakteraszites für SNP13 Allelträger und Wildtypträger retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 2,30		SNP13	
		Wildtyp	heterozygot
		Anzahl	Anzahl
Bakteraszites	Negativ	124	6
	Positiv	18	2

Außerdem war das Risiko einen Bakteraszites zu entwickeln, gemessen über allen drei Polymorphismen, signifikant erhöht ($p= 0,023$; OR= 2,98). Für Anlageträger der SNP 8 und 13 ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.

Tab. 9: Häufigkeiten und Risiko eines Bakteraszites für Allelträger eines der drei Risikoallele retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: p= 0,023

Odds ratio: 2,98		SNP 8,12,13	
		Wildtyp	Heterozygot
		Anzahl	Anzahl
Bakteraszites	Negativ	102	28
	Positiv	11	9

3.2.2 Auftreten einer SBP retrospektiv und prospektiv in den verschiedenen Gruppen

In den Tabellen 10, 11, 12 und 13 sind die absoluten Häufigkeiten für eine SBP retrospektiv und prospektiv, die Signifikanz gemessen durch den Chi²-Test, sowie das Risiko, eine SBP zu entwickeln, für die einzelnen SNP aufgeführt.

Für die einzelnen SNP ergeben sich hierbei keine signifikanten Zusammenhänge.

Gemessen über allen drei Risikoallelen ist das Risiko für Träger eines dieser Allele, eine SBP zu entwickeln, signifikant erhöht (p= 0,004; OR= 3,41).

Tab. 10: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für SNP8 Allelträger und Wildtypträger retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 2,05		SNP8	
		Wildtyp	Heterozygot
		Anzahl	Anzahl
SBP retrospektiv oder prospektiv	keine SBP	88	10
	SBP	43	9

Tab. 11: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für SNP12 Allelträger und Wildtypträger retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 3,39		SNP12	
		Wildtyp	heterozygot
		Anzahl	Anzahl
SBP retrospektiv oder prospektiv	keine SBP	94	4
	SBP	46	6

Tab. 12: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für SNP13 Allelträger und Wildtypträger retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 3,71		SNP13	
		Wildtyp	Heterozygot
		Anzahl	Anzahl
SBP retrospektiv oder prospektiv	keine SBP	95	3
	SBP	47	5

Tab. 13: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für Träger eines Risikoallels retrospektiv und prospektiv Chi²-Test: signifikant $p= 0,004$

Odds ratio: 3,41		SNP 8, 12, 13	
		Wildtyp	Heterozygot
		Anzahl	Anzahl
SBP retrospektiv oder prospektiv	keine SBP	81	17
	SBP	32	20

3.2.3 Auftreten einer SBP nur prospektiv in den verschiedenen Gruppen

In den Tabellen 14, 15, 15 und 17 sind die absoluten Häufigkeiten für eine SBP nur für einen prospektiven Beobachtungszeitraum, die Signifikanz gemessen durch den Chi²-Test, sowie das Risiko, eine SBP zu entwickeln, für die einzelnen SNP aufgeführt.

Patienten mit dem Risikoallel SNP 8 haben für diesen Beobachtungszeitraum ein knapp signifikant erhöhtes Risiko, eine SBP zu entwickeln ($p= 0,05$; OR= 2,74).

Das Risiko für eine SBP über allen drei Allelen ist hier ebenfalls signifikant erhöht ($p= 0,008$; OR= 3,06).

Tab. 14: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für SNP 8 Allelträger und Wildtypträger nur prospektiv Chi²-Test: signifikant $p= 0,05$

Odds ratio: 2,74		SNP8	
		Wildtyp	Heterozygot
		Anzahl	Anzahl
SBP prospektiv	keine SBP	108	12
	SBP	23	7

Tab. 15: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für SNP 12 Allelträger und Wildtypträger nur prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 1,79	SNP12	
	Wildtyp	Heterozygot
	Anzahl	Anzahl
SBP prospektiv keine SBP	113	7
SBP	27	3

Tab. 16: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für SNP 13 Allelträger und Wildtypträger nur prospektiv Chi²-Test: nicht signifikant

Odds ratio: 2,56	SNP13	
	Wildtyp	Heterozygot
	Anzahl	Anzahl
SBP prospektiv keine SBP	115	5
SBP	27	3

Tab. 17: Häufigkeiten und Risiko einer SBP für Träger eines Risikoallels nur prospektiv Chi²-Test: signifikant p= 0,008

Odds ratio: 3,06	SNP 8, 12, 13	
	Wildtyp	Heterozygot
	Anzahl	Anzahl
SBP prospektiv keine SBP	96	24
SBP	17	13

3.3 Überleben in den Gruppen

3.3.1 Todesursachen

Während des Zeitraums der Nachbeobachtung von März 2006 bis November 2008 verstarben 53 der 150 Patienten. 30 Patienten hatten ein Wildtypgenom und 23 waren heterozygote Anlageträger für SNP 8, 12 oder 13.

Von 47 Patienten konnte die Todesursache ermittelt werden. 2 Patienten wurden im Beobachtungszeitraum lebertransplantiert. Für 15 Patienten konnte die Todesursache nicht exakt bestimmt werden und wurde unter „Folgen der Leberzirrhose“ zusammengefasst.

Tabelle 18 können die Häufigkeiten der einzelnen Todesursachen entnommen werden, in Tabelle 19 sind diese unterteilt für Patienten mit einem Wildtypgenom und heterozygoten Anlageträgern.

Tab. 18: Absolute Häufigkeiten der Todesursachen

	Häufigkeit
Sepsis	7
Pneumonie	3
Coma hepaticum	7
Hepatorenales Syndrom	8
Hepatozelluläres Karzinom	3
Ösophagusvarizenblutung	3
Akutes Leberversagen	1
Folgen der Leberzirrhose	15
Lebertransplantation	2
Gesamt	49

Tab. 19: Häufigkeiten der Todesursachen unterteilt nach Wildtyp und heterozygoten Anlageträgern

	SNP 8, 12, 13	
	Wildtyp	Heterozygot
Pneumonie	2 (2 %)	1 (3 %)
Sepsis	4 (4 %)	1 (3 %)
Coma hepaticum	5 (4 %)	2 (5 %)
HRS	4 (4 %)	4 (11 %)
HCC	2 (2 %)	1 (3 %)
Ösophagusvarizenblutung	2 (2 %)	1 (3 %)
Akutes Leberversagen	1 (1 %)	0 (0 %)
Folgen der Leberzirrhose	6 (5 %)	9 (24 %)
oLTX	2 (2 %)	0 (0 %)
Gesamt	28 (25 %)	21 (57 %)

3.3.2 Unterschiede in der Mortalität für die einzelnen Genotypen

Das mittlere Überleben der Patienten lag insgesamt bei 327 Tagen.

Patienten mit einem Wildtyp Genom überlebten im Mittel 377 Tage, Patienten mit einem der drei Risikoallele im Mittel 223 Tage.

Für die Patienten mit einem heterozygoten Genotyp lag der Mittelwert für das Überleben im Einzelnen bei: SNP8 252 Tage, SNP12 193 Tage, SNP13 164 Tage.

Für SNP 8, 12 und 13 zeigt sich auch in den dargestellten Kaplan-Meier-Kurven ein kürzeres Überleben der Patienten, die heterozygote Anlageträger für eines der Allele sind. Diese Unterschiede stellen sich im log rank-Test jedoch als nicht signifikant dar (s. Diagramme 1, 2, 3). Patienten, die für irgendeines der drei Risikoallele heterozygot sind, haben jedoch ein signifikant kürzeres Überleben im Vergleich zu Patienten, die einen Wildtyp haben ($p=0,002$ s. Diagramm 4).

Diagramm 1: Überlebenskurven von Wildtyp und SNP8 Anlageträgern prospektiv. 0-Zeitpunkt ist die erste Aszitespunktion im Rahmen der Studie

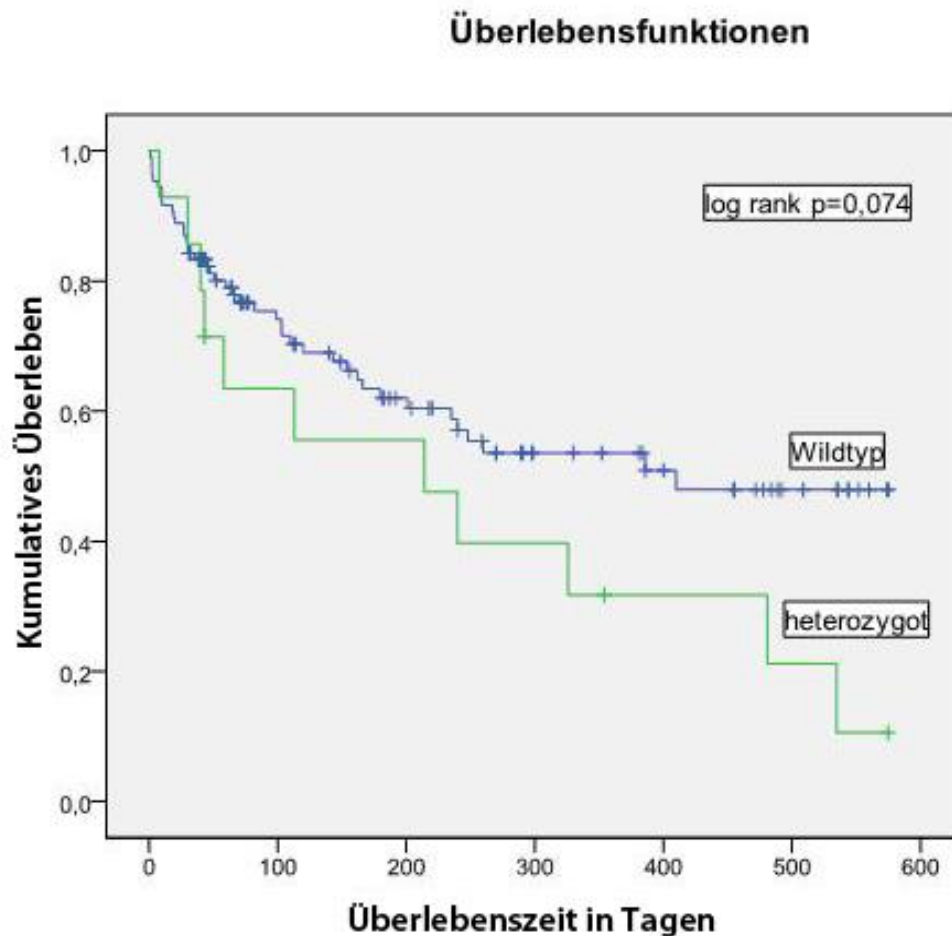


Diagramm 2: Überlebenskurven von Wildtyp und SNP12 Anlageträgern prospektiv. 0-Zeitpunkt ist die erste Aszitespunktion im Rahmen der Studie

Überlebensfunktionen

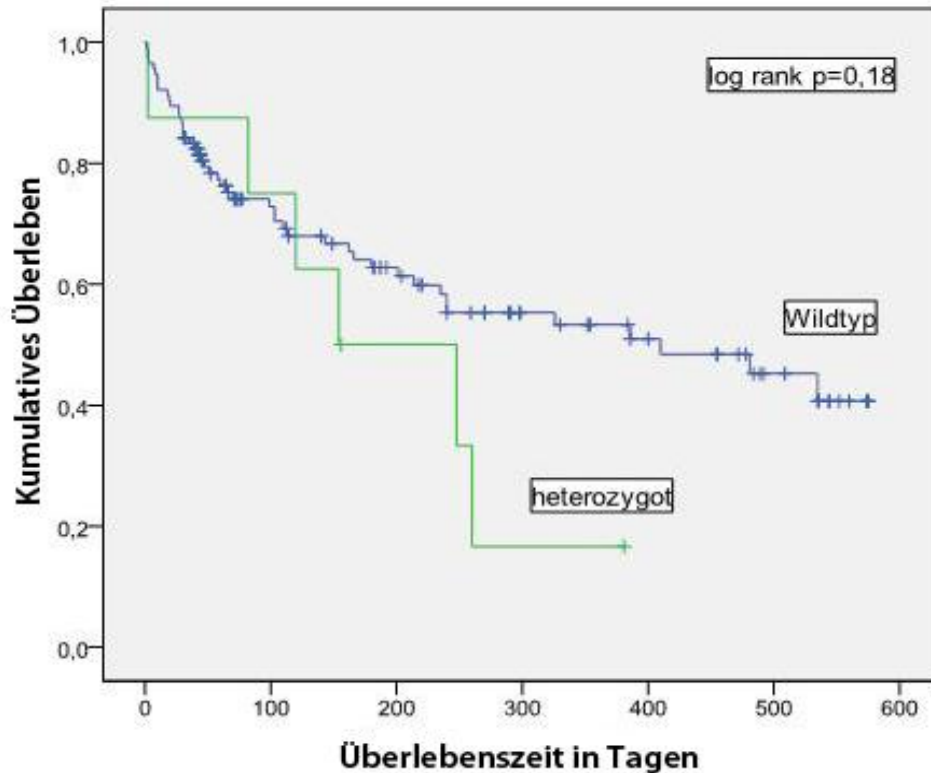


Diagramm 3: Überlebenskurven von Wildtyp und SNP13 Anlageträgern prospektiv. 0-Zeitpunkt ist die erste Aszitespunktion im Rahmen der Studie

Überlebensfunktionen

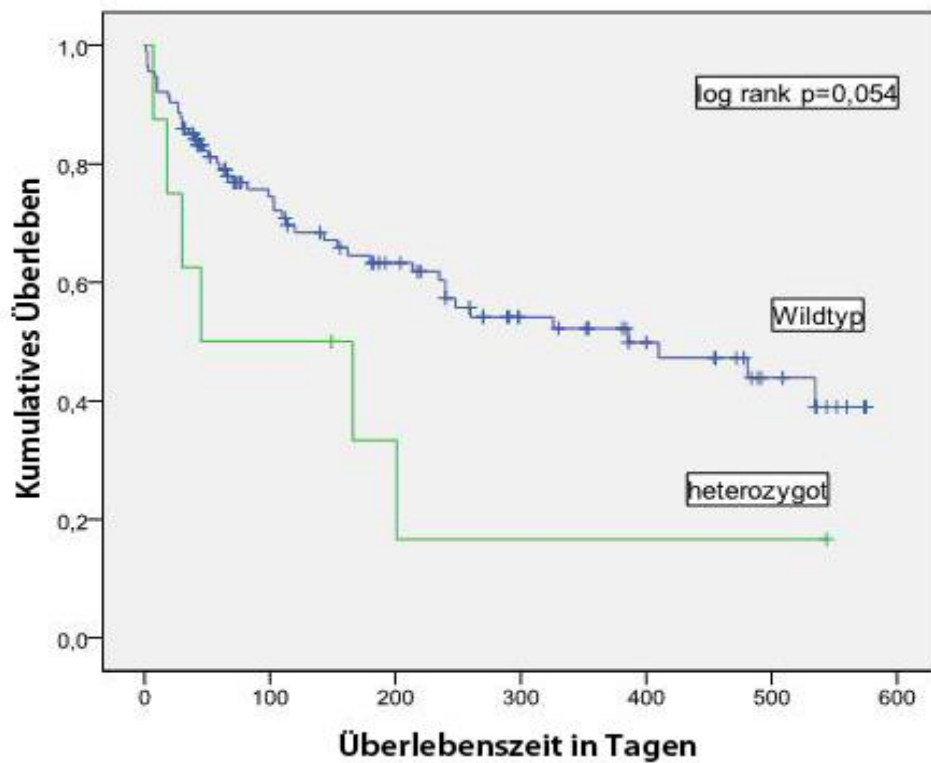


Diagramm 4: Überlebenskurven von Wildtyp und SNP 8, 12 oder 13 Anlageträgern prospektiv. 0-Zeitpunkt ist die erste Aszitespunktion im Rahmen der Studie

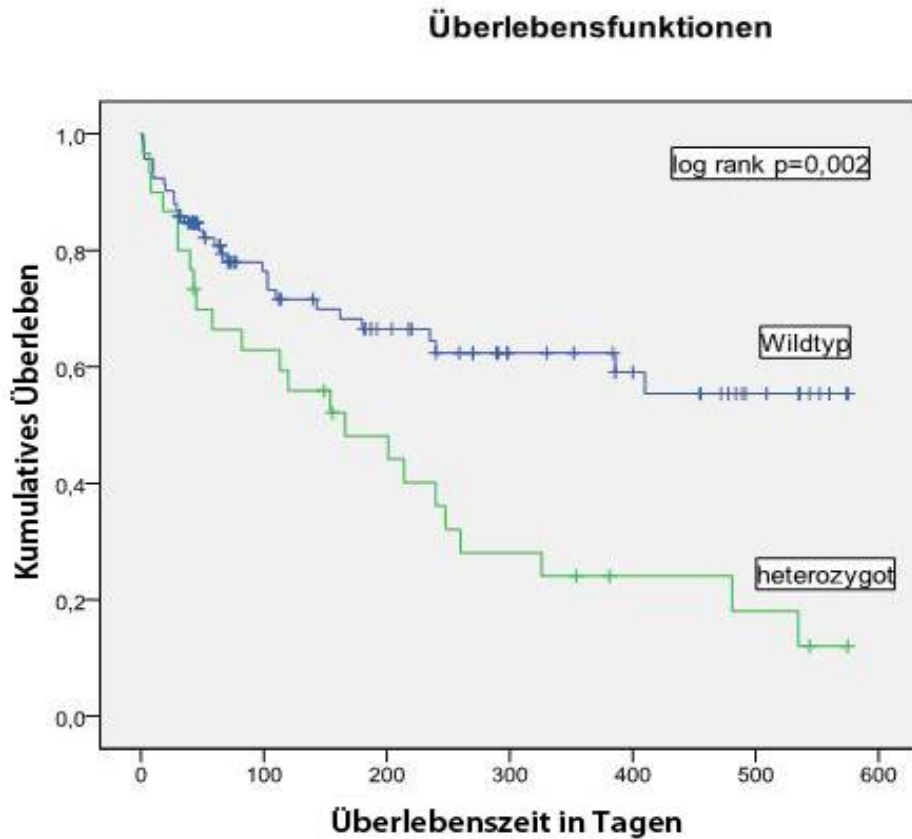
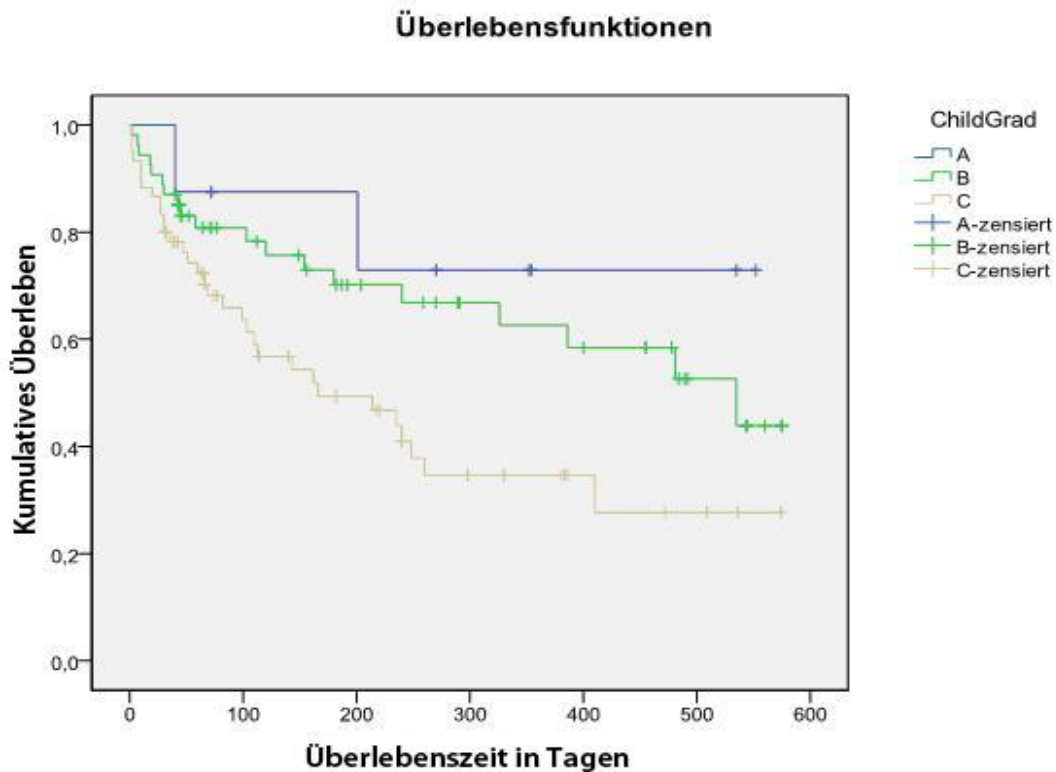


Diagramm 5: Überlebenskurven in Abhängigkeit vom Child Grad. 0-Zeitpunkt ist die erste Aszitespunktion im Rahmen der Studie



3.3.4 Mortalität nach Child Grad

Die durchschnittliche Überlebenszeit für Patienten, die bei Einschluss in die Studie einen Child Grad A hatten, betrug 437 Tage, mit Child Grad B 385 Tage und mit Child Grad C 256 Tage. In Diagramm 5 sind dazu die Kaplan-Meier-Kurven unterteilt nach den Child Graden dargestellt.

3.4 Risikofaktoren und Überlebenszeit

3.4.1 Univariate Risikofaktoren für die Überlebenszeit

In der Tabelle 20 sind die in der univariaten Analyse als unabhängige Risikofaktoren für eine kürzere Überlebenszeit ermittelten Werte aufgeführt.

Tab. 20: Univariate Analyse ausgewählter Risikofaktoren in Bezug auf das Gesamtüberleben

	Odds ratio	Signifikanzniveau
Alter		0,670
Albumin	0,94	0,020
männliches Geschlecht	2,65	0,022
MELD score (pro Punkt)	1,05	0,029
NOD2 Risikoallel	3,88	0,001
SBP	4,21	0,001

3.4.2 Multivariate Risikofaktoren für die Überlebenszeit

In der Tabelle 21 sind die in der multivariaten Analyse als unabhängige Risikofaktoren für eine kürzere Überlebenszeit ermittelten Werte aufgeführt.

Tab. 21: Multivariate Analyse der Risikofaktoren in Bezug auf das Gesamtüberleben

	Odds ratio	Signifikanzniveau
MELD score	1,78	0,005
NOD2 Risikoallel	4,32	0,001
SBP	3,76	0,005

4. Diskussion

4.1 Einleitung

Die Bedeutung der SNP 8,12 und 13 im CARD15 Gen für die Entstehung eines Morbus Crohn konnten in jüngster Vergangenheit belegt werden. Für weitere Erkrankungen, wie dem Blau Syndrom und der early onset sarcoidosis, konnte ein Zusammenhang hergestellt werden (Borzutzky et al., 2009).

In dieser Arbeit untersuchen wir an einem Studienkollektiv von 150 Patienten, die sich stationär in der Universitätsklinik Bonn zwischen März 2006 und November 2007 vorgestellt haben, ob es einen Zusammenhang dieser Polymorphismen und dem Auftreten einer SBP und einer erhöhten Mortalität gibt.

Es soll diskutiert werden, in wieweit die genannten Polymorphismen unabhängige Marker für das Erkrankungsrisiko sind und welchen Einfluss sie auf die Prognose der Patienten haben.

4.2 Die Bedeutung anderer Parameter für das Auftreten einer SBP

Im folgenden Abschnitt soll die Bedeutung anderer Parameter für das Auftreten einer SBP diskutiert werden. Im Ergebnisteil wurde die Bedeutung verschiedener Laborparameter und die Therapie mit Antibiotika im Studienkollektiv dargestellt. Die mögliche Bedeutung für das Auftreten einer SBP soll hier diskutiert werden.

Außerdem soll erörtert werden, inwiefern die Häufigkeitsverteilung der einzelnen SNP der Normalbevölkerung entspricht.

4.2.1 Vergleich beider Gruppen hinsichtlich ausgewählter Laborparameter

Im Ergebnisteil konnte dargestellt werden, dass es hinsichtlich laborchemischer Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, also Patienten mit einem Wildtypgenom und heterozygoten Anlageträgern eines der Allele gibt.

Darüber hinaus waren zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses die Patienten in beiden Gruppen hinsichtlich der Schwere ihrer Erkrankung gleich verteilt, denn es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei MELD Score und Child Grad. Die Patienten waren somit hinsichtlich der bekannten Risikofaktoren für das Auftreten

einer SBP in beiden Gruppen gleich verteilt und unterschieden sich nur durch ihren Genotyp.

In der multivariaten Analyse zeigten sich neben den anerkannten Risikofaktoren bezüglich der Überlebenszeit dem MELD Score und der Spontan Bakteriellen Peritonitis auch das Vorhandensein eines der drei Risikoallele als unabhängiger Risikofaktor.

Das Vorhandensein eines dieser Risikoallele war sogar mit der höchsten Odds ratio von 4,32 und somit mit der schlechtesten Prognose verbunden.

4.2.2 Einfluss einer antibiotischen Therapie

Zum Einschlusszeitpunkt in die Studie erhielten einige der Patienten in beiden Gruppen eine Therapie mit Antibiotika, der Unterschied war mit 35 zu 31 Prozent in der Gruppe der heterozygoten Anlageträger sogar leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Trotzdem haben Patienten, die Träger eines der SNP sind, eine signifikant erhöhte Mortalität.

Saab et al. (2009) konnten in ihrer Metaanalyse zeigen, dass durch eine Prophylaxe mit Antibiotika die Häufigkeit einer SBP gesenkt und das Überleben verlängert werden konnte.

In unserer Studie wird der Einfluss einer antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie berücksichtigt. Eine Aussage über den gesamten Beobachtungszeitraum lässt sich daraus nicht ableiten, weshalb diese beiden Ergebnisse nicht im Widerspruch zueinander stehen.

Die Anzahl an SBP Episoden in der Gruppe der Patienten, die zum Einschlusszeitpunkt eine Therapie mit Antibiotika bekamen, war nicht signifikant unterschiedlich zur Gruppe der Patienten, die keine Therapie erhielten. Somit kann zumindest für den Einschlusszeitpunkt gesagt werden, dass eine Therapie mit Antibiotika hier keinen direkten Einfluss auf die Anzahl der SBP Episoden hatte.

Wie der Einfluss einer Antibiotikatherapie auf die Anzahl der SBP Episoden im Verlauf oder das Überleben ausfällt, kann abschließend nicht angegeben werden. Zum Einschlusszeitpunkt in die Studie gab es jedoch hinsichtlich der Antibiotikatherapie keine Unterschiede in beiden Gruppen.

4.2.3 Häufigkeitsverteilung der einzelnen Polymorphismen im Kollektiv

Für die Aussagekraft der Ergebnisse und um schließlich eine gültige Risikoprognose für weitere Patienten mit einer Leberzirrhose erstellen zu können, ist es wichtig zu wissen, dass das untersuchte Patientenkollektiv hinsichtlich des Genotypes einen repräsentativen Querschnitt der Bevölkerung darstellt.

Die einzelnen Häufigkeiten sind in Tabelle 3 im Abschnitt 3.1 dargestellt.

Bünning et al. 2004 konnten für eine Gruppe kaukasisch stämmiger Westeuropäer einen Anteil von insgesamt 15,5 % (15/97) für heterozygote Merkmalsträger im untersuchten Patientengut ermitteln.

Weltweit und auch in Westeuropa gibt es starke geographische Unterschiede für das Vorkommen der untersuchten SNP (Cavanaugh, 2006).

Dies wird hauptsächlich durch sogenannte „local founder effects“ erklärt. Damit ist gemeint, dass die Verbreitung einer bestimmten genetischen Variante in einer Population auf eine gemeinsame Person zurückzuführen ist.

Eine abschließende Aussage, ob es sich bei dem untersuchten Patientenkollektiv um eine für Westdeutschland repräsentative Gruppe handelt, kann nicht gegeben werden, da eine Vergleichsgruppe fehlt und in der Literatur deutliche regionale Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung für die untersuchten Polymorphismen zu finden sind.

Allerdings kann man sagen, dass es auf Grund der weit gefassten Einschlusskriterien in die Studie zu keiner Selektion des Patientengutes gekommen sein kann und somit das untersuchte Patientengut hinsichtlich der Häufigkeit auch der einzelnen Genotypen repräsentativ für alle Patienten mit Leberzirrhose und Aszites an der Medizinischen Klinik der Universität Bonn ist.

Inwiefern die genannten Ergebnisse auf andere Regionen Deutschlands und Europas übertragbar sind, wäre sicherlich durch weitere Studien zu klären.

4.3 Risiko für Bakteraszites und SBP bei heterozygoten Anlageträgern

4.3.1 Das Risiko für Bakteraszites bei heterozygoten Anlageträgern

Patienten mit einem NOD2 Polymorphismus haben ein signifikant erhöhtes Risiko, einen Bakteraszites zu entwickeln (OR= 2,98).

Dieses Ergebnis deckt sich mit der im Einleitungsteil erläuterten Annahme, dass Patienten mit einem der NOD2 Polymorphismen eine gestörte Funktion der

Darmbarrriere haben, also durch die Veränderung im NOD2 Protein bakterielle Zellwandbestandteile im intrazellulären Raum nicht ausreichend an das NOD2 Protein binden, welches als zytoplasmatischer Rezeptor für Muramyl-dipeptid fungiert, wodurch es zu einer verminderten Immunantwort kommt.

Durch diese gestörte Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen könnte es somit häufiger zu einer bakteriellen Translokation und letztlich zu einem Übertreten von Bakterien in die Aszitesflüssigkeit kommen.

Der Nachweis von Bakterien in der Aszitesflüssigkeit ist insgesamt seltener als der Nachweis einer SBP und geht auch nicht immer mit der Diagnose einer SBP einher (Canete et al., 2007; Fleig et al., 2004; Thévenot et al., 2004).

Insgesamt hatten nur 20 Patienten im gesamten Untersuchungszeitraum, also retrospektiv und prospektiv einen Bakteraszites, davon hatten elf Patienten ein Wildtypgenom und neun waren heterozygote Anlageträger. Korreliert man dies mit der relativ geringen Allelfrequenz der SNP mit insgesamt 25 Prozent in dieser Studie, so ist selbst für diesen langen Beobachtungszeitraum eine Beurteilung der Ergebnisse schwierig.

Betrachtet man nun die Assoziation der einzelnen Polymorphismen mit dem Auftreten eines Bakteraszites, so lassen sich hier auf Grund der noch kleineren Fallzahlen allenfalls Hypothesen für weitere Studien ableiten.

Im Ergebnisteil hat sich gezeigt, dass Patienten mit dem SNP 12 signifikant häufiger einen Bakteraszites entwickeln als Patienten mit Wildtypgenom. Das Risiko ist für diese Patienten sogar stark erhöht (OR= 5,17), allerdings entwickelten Patienten mit dem SNP 12 nicht häufiger eine SBP, daher ist die Relevanz dieses Befundes unklar. Das Ergebnis für die einzelnen SNP müsste hier sicherlich noch durch ein größeres Studienkollektiv verifiziert werden. Warum gerade Patienten mit dem SNP 12 ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Bakteraszites haben, bleibt auch auf Grund der bisherigen pathophysiologischen Erkenntnisse unklar. Barnich et al. 2004 konnten mit Zellkulturen zeigen, dass der SNP 13 zu einer fehlenden Membranassoziation und dadurch zu einer geringeren NF- κ B Aktivität führt, für den SNP 12 konnten in der genannten Arbeit allerdings keine Auffälligkeiten gefunden werden.

4.3.2 Das Risiko für eine SBP bei heterozygoten Anlageträgern

Patienten mit einem der Polymorphismen haben ein signifikant erhöhtes Risiko, eine SBP zu entwickeln. Die SBP wird hierbei als Reaktion des Körpers auf eine bakterielle Besiedlung des Aszites verstanden (Guarner et al., 1997; Runyon et al., 1994; Llovet et al., 1998).

Das Risiko für eine SBP ist dabei sowohl bei einer retrospektiven Betrachtung (OR= 3,41), als auch bei einer rein prospektiven Betrachtung (OR= 3,06) signifikant erhöht, dabei ist das Ergebnis für den prospektiven Beobachtungszeitraum sicher aussagekräftiger.

In diesem Beobachtungszeitraum hatten 30 Patienten eine SBP. Dieses Ergebnis passt in die in der Literatur vorhandenen Häufigkeiten für eine SBP (Caly et al., 1993; Rimola et al., 2000; Fleig et al., 2004) und liegt somit im erwarteten Bereich.

Die Anzahl von 30 SBP Episoden bei prospektiver Datenerfassung stellt zudem eine ausreichende Anzahl an Fällen dar, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten.

Bei gleichzeitiger Betrachtung auch von retrospektiven Daten, also Ergebnissen von Parazentesen aus der Zeit vor Einschluss der Patienten in die Studie, vergrößert sich die Anzahl von SBP Fällen auf 52.

Die Daten für die retrospektive Auswertung stammen ebenfalls fast ausschließlich aus Diagnosen, die durch mikroskopische Differenzierung der Zellen durch das Hämatologische Labor der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Bonn erhoben wurden. Die Methode der Datenerhebung unterscheidet sich somit nicht grundsätzlich von der, der rein prospektiven Daten.

Bei beiden zu Grunde gelegten Zeiträumen sind die Ergebnisse fast deckungsgleich, was für die Stetigkeit der Ergebnisse spricht.

Für den SNP 8 findet sich bei prospektiver Betrachtung der Daten ein erhöhtes Risiko für eine SBP (OR= 2,74), dieses Ergebnis ist allerdings nur knapp signifikant und findet sich bei der retrospektiven Datenanalyse nicht. Insgesamt hatten nur sieben Patienten mit einer SBP auch das SNP 8 Allel. Auch für diese Untergruppe ist bisher kein hinreichendes Wissen über die pathophysiologischen Folgen dieses SNP bekannt.

Patienten mit einem der Polymorphismen haben häufiger einen Bakteraszites, als auch eine SBP im Vergleich zu Patienten mit einem Wildtypgenom. Diese Beobachtungen passen zu der Theorie, dass die bakterielle Translokation und in

deren Folge der Bakteraszites wiederholt vorkommende Ereignisse darstellen (Guarner et al., 1997; Runyon et al., 1994; Llovet et al., 1998).

Bei Patienten mit einem der untersuchten Polymorphismen steigt somit auch die Gefahr, dass aus einer bakteriellen Besiedlung des Aszites eine Infektion im Sinne einer SBP werden kann, da diese Patienten häufiger zu Bakteraszites neigen.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass eine SBP mit einer erhöhten Mortalität auch unter optimaler Therapie mit Antibiotika verbunden ist (Hoefs et al., 1985; Pelletier et al., 1990; Cho et al., 2007; Rimola et al., 2000). Rincon et al. (2014) konnten in einer kleinen Pilotstudie an 17 Patienten Hinweise dafür finden, dass eine Therapie mit Probiotika den portalen Blutfluss verbessern und die bakterielle Translokation vermindern können. Es ist jedoch noch unklar, ob durch solch eine Therapie die Häufigkeit, an einer SBP zu erkranken, sinken könnte oder sich gar ein günstiger Effekt auf die Prognose der Patienten erzielen lässt. Insbesondere ist nicht geklärt, ob Patienten mit einer der NOD2 Polymorphismen von einer Therapie mit Probiotika profitieren können.

4.4 Bedeutung der SNP8, 12 und 13 im CARD15 Gen für das Überleben der Patienten

In Abschnitt 3.3.2 konnte dargestellt werden, dass Patienten, die Anlageträger eines der SNP sind, ein signifikant kürzeres Überleben haben im Vergleich zu Patienten mit einem Wildtyp. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung, dass diese Patienten häufiger eine SBP und häufiger einen Bakteraszites ausbilden.

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich beide untersuchten Patientengruppen hinsichtlich laborchemischer und prognostischer Marker, wie Child und MELD Score, nicht signifikant, deshalb kann man davon ausgehen, dass die Patienten hinsichtlich der Schwere ihrer Grunderkrankung in beiden Gruppen gleich verteilt sind und diese Faktoren bei der Auswertung keinen Einfluss auf die Prognose hatten.

In Diagramm 5 ist die Sterblichkeit nach dem Child-Pugh Grad aufgetragen. Wie bereits in der Literatur zu finden, bildet der Child-Pugh Grad eine Größe zur Einschätzung der Prognose von Patienten mit Leberzirrhose. Dieses Ergebnis konnte auch in dieser Studie verifiziert werden, was für die Bedeutung dieser Prognosemarker auch für das untersuchte Patientenkollektiv spricht. Somit kann man

davon ausgehen, dass die untersuchten SNP unabhängige Prognosemarker bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites darstellen.

Betrachtet man das Überleben hinsichtlich der einzelnen SNP, so sind deutliche Unterschiede im mittleren Überleben im Vergleich zum Wildtyp feststellbar. Diese Unterschiede, welche sich auch graphisch in den Kaplan-Meier Kurven widerspiegeln, sind allerdings statistisch nicht signifikant. Der Grund dafür, dass zwar jeweils eine deutliche Tendenz zu erkennen ist, allerdings kein signifikanter Zusammenhang zu finden ist, liegt auch hier am ehesten in der kleinen Fallzahl, betrachtet man nur die einzelnen SNP.

Um an dieser Stelle eine Aussage darüber treffen zu können, ob einer der SNP hinsichtlich der Prognose eine besondere Rolle spielt oder alle drei SNP gleich zu gewichten sind, wäre eine größere Studie mit mehr Patienten notwendig.

Für die Todesursachen gibt es in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Betrachtet man Todesursachen, bei denen Bakterien ursächlich sind, also Tod durch Sepsis und Tod durch Pneumonie, so finden sich auch hierfür keine Unterschiede in beiden Gruppen. Für diese beiden Entitäten wäre es durchaus denkbar gewesen, dass Patienten mit einem der SNP häufiger an einer dieser bakteriellen Komplikationen versterben. Diese Überlegung basiert auf der Annahme, dass diese Patienten eine generell herabgesetzte Abwehr gegen bakterielle Infektionen haben und deshalb häufiger an bakteriellen Komplikationen leiden und letztlich auch versterben.

Insgesamt verstarben zehn Patienten an einer Sepsis oder Pneumonie, vier in der heterozygoten Gruppe und sechs Patienten mit einem Wildtyp. Diese kleine Fallzahl könnte ein Grund dafür sein, dass hier kein Zusammenhang gefunden werden konnte.

Insgesamt gestaltete sich die Ermittlung der Todesursache schwierig, da einige Patienten nicht in Krankenhäusern verstarben und die Todesursache nicht genau differenziert wurde und letztlich einfach auf die Leberzirrhose als Grunderkrankung zurückgeführt wurde. Dieses Problem betraf insgesamt fünfzehn der verstorbenen Patienten und dürfte in der Schwere der Erkrankung begründet liegen, die es schwierig macht, bei einer weiteren Verschlechterung des Allgemeinzustandes die genaue Ursache festzumachen, welche letztlich zum Tode geführt hat.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden 150 Patienten mit Leberzirrhose und Aszites hinsichtlich einer Assoziation zwischen den drei Polymorphismen SNP 8, 12 und 13 im CARD15 Gen und eines erhöhten Auftretens einer SBP untersucht.

Außerdem wurde betrachtet, welchen Einfluss diese Polymorphismen auf das Überleben der Patienten haben.

Bei Einschluss in die Studie gab es zwischen der Gruppe der Patienten mit einem Wildtypgenom und den Patienten, die heterozygot für einen der drei Polymorphismen sind, keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich laborchemischer Parameter, MELD oder Child-Pugh Grad.

Hinsichtlich der Behandlung mit Antibiotika ist zwischen beiden Gruppen ebenfalls kein Unterschied festzustellen.

Das Risiko einen Bakteraszites zu entwickeln ist, über alle drei SNP gemessen, für Anlageträger eines der SNP signifikant erhöht (OR= 2,98). Das Risiko eine SBP zu entwickeln ist für diese Gruppe ebenfalls signifikant erhöht (OR= 3,06 bei prospektiver Auswertung).

Hinsichtlich der Mortalität gibt es in beiden Gruppen signifikante Unterschiede:

Patienten mit einem Wildtypgenom haben eine mittlere Überlebenszeit von 377 Tagen und Patienten mit einem der drei SNP von 223 Tagen ($p= 0,002$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SNP 8, 12 und 13 im CARD15 Gen einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten eines Bakteraszites und einer SBP bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites darstellen.

Patienten mit einem der drei Risikoallele haben eine stark erhöhte Mortalität.

Diese Ergebnisse wurden auch durch die Studie von Bruns et al. bestätigt.

Die in der Arbeit von Nischalke et al. gefundene Assoziation zwischen Mutationen im Toll-like Rezeptor 2 Gen und einem gehäuften Auftreten einer SBP ist interessant, da in der Zweiten der dargelegten Theorien zur Funktion des NOD 2 Proteins, die Regulation des TLR-2 Signalweges als Ursache der gestörten intestinalen Immunabwehr steht. Diese Studie gibt somit einen Hinweis darauf, dass es sich bei der Enthemmung des TLR-2/ IL-12 Signalweges durch die hier untersuchten Polymorphismen um den entscheidenden Pathomechanismus handeln könnte.

Für die Zukunft könnten so Risikopatienten gefunden werden, welche einer engmaschigeren Überwachung bedürfen. Ebenfalls könnten durch die Entdeckung

weiterer Polymorphismen Hochrisikopatienten erkannt werden, die durch die Kombination verschiedener Polymorphismen ein stark erhöhtes Risiko für das Auftreten einer SBP haben.

Der Effekt einer Prophylaxe einer SBP durch Antibiotika, als eine denkbare Möglichkeit die Prognose zu verbessern, sollte bei diesen Risikopatienten diskutiert werden.

6. Anhang

Glossar

ADH/ Antidiuretisches Hormon:

ein Hormon des Hypophysenvorderlappens, dass in den Sammelohren der Nieren zu einer vermehrten Rückresorption von Wasser führt. Zusätzlich kann es vasokonstriktorisch wirken und führt auch dadurch zu einem Anstieg des Blutdruckes.

Caspasen:

Sind Cysteinproteasen, welche Peptidbindungen spalten und sind die wichtigsten Enzyme der Apoptose, dem induzierten Zelltod. Außerdem spielen Caspasen eine wichtige Rolle bei proinflammatorischen Vorgängen.

Child-Pugh Score/ Child-Turcotte-Pugh Score:

Dient zur Stadieneinteilung und Prognoseabschätzung von Patienten mit Leberzirrhose. Eingang finden Serum Albuminkonzentration, Bilirubinkonzentration, die INR, sowie das Vorhandensein von Aszites und hepatischer Enzephalopathie.

Defensine:

Sind kleine Peptide mit 3 Disulfidbrücken. Sie werden mukosal sezerniert und dienen der Abwehr von Bakterien und Pilzen als Teil der angeborenen Immunität.

LRR/ leucin rich repeats:

Diese zeichnen sich durch den hohen Gehalt an der Aminosäure Leucin aus und bildet eine schleifenartige Struktur (loop), welche der Erkennung von bakteriellen Zellwandbestandteilen dient und sind Bestandteile der Proteine der NLR Proteinfamilie.

MELD Score/ Model for End-stage liver disease:

Ist ein Score zur Beurteilung des Schweregrades einer Leberzirrhose und dient als Kriterium bei der Listung zur Lebertransplantation. Eingang finden Serumkreatinin und Bilirubin, sowie die INR.

MDP/ Muramyl-dipeptid:

Ist ein Aminosucker und Bestandteil von bakteriellen Zellwänden sowohl grampositiver als auch gramnegativer Bakterien. Er ist Ligand des NOD2 Rezeptors. Synthetische Analoga werden für die Therapie des Osteosarkoms erprobt.

NLR Proteine/ NOD-like Rezeptor Proteine:

Proteinfamilie denen die nuclear oligomerization domain gemeinsam ist (siehe NOD).

NOD/ nuclear oligomerization domain:

Ist sowohl die Bezeichnung einzelner Proteine (NOD1, NOD2) als auch eines speziellen Motivs innerhalb von Proteinen, welches dazu dient mehrere Proteine zu verbinden (Oligomerization) und die Transkription bestimmter Gene zu verstärken durch spezielle Bindungsstellen an der DNA.

RAAS/ Renin-Aldosterin-Angiotensin-System:

Ist eine Kaskade aus den genannten Hormonen und Enzymen, die im wesentlichen den Salz- und Wasserhaushalt des Körpers regulieren.

SBP/ Spontan bakterielle Peritonitis:

Ist definiert durch mehr als 250 Neutrophile Granulozyten pro μL Aszites und stellt eine Komplikation bei Patienten mit Leberzirrhose und Aszites dar.

SNP/ single nucleotide polymorphism:

Beschreibt eine Veränderung der DNA durch den Austausch oder die Deletion einer einzigen Base. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserasters oder zu einem Strangabbruch bei der Translation.

7. Literaturverzeichnis

Adibi SA. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterol* 1997; 113: 332-340

Albillos A, Cuervas-Mons V, Millán I, Cantón T, Montes J, Barrios C, Garrido A, Escartín P. Ascitic fluid polymorphonuclear cell count and serum to ascites albumin gradient in the diagnosis of bacterial peritonitis. *Gastroenterol* 1990; 98: 134-140

Almeida PR, Camargo NS, Arenz M, Tovo CV, Galperim B, Behar P. Spontaneous bacterial peritonitis: impact of microbiological changes. *Arq Gastroenterol* 2007; 44: 68-72

Andreu M, Sola R, Sitges-Serra A, Alia C, Gallen M, Vila MC, Coll S, Oliver MI. Risk factors for spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients with ascitis. *Gastroenterol* 1993; 104: 1133-1138

Arroyo V, Cárdenas A, Bataller R. Mechanisms of ascites formation. *Clin Liver Dis* 2000; 4: 447-465

Barreiro-de-Acosta M, Mendoza JL, Lana R, Domínguez-Muñoz JE, Díaz-Rubio M. NOD2/CARD15: geographic differences in the Spanish population and clinical applications in Crohn's disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2010; 102: 321-326

Barnich N, Aguirre JE, Reinecker HC, Xavier R, Podolsky DK. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor kappaB activation in muramyl dipeptide recognition. *J. Cell Biol* 2005; 170: 21-26

Bobadilla M, Sifuentes J, Garcia-Tsao G. Improved method for bacteriological diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2145-2147

Borzutzky A, Fried A, Chou J, Bonilla FA, Kim S, Dedeoglu F. NOD2-associated diseases: Bridging innate immunity and autoinflammation. *Clin Immunol* 2009; Epublication ahead of print

Bosch J, García-Pagán JC. Complications of cirrhosis. I. Portal hypertension. *J Hepatol* 2000; 32: 141-156

Bruns T, Peter J, Reuken PA, Grabe DH, Schuldes SR, Brenmoehl J, Schölmerich J, Wiest R, Stallmach A. NOD2 gene variants are a risk factor for culture-positive spontaneous bacterial peritonitis and monomicrobial bacterascites in cirrhosis. *Liver International* 2012; 32: 223-230

Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infections in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993; 18: 353-358

Casafont F, Sánchez E, Martín L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 1997; 25: 1334-1337

Castellote J, Xiol X, Verdaguer R, Ribes J, Guardiola J, Gimenez A, Casais L. Comparison of two ascitic fluid culture methods in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1605-1608

Cavanaugh J. NOD2: ethnic and geographic differences. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3673-3677

Cho JH, Park KH, Kim SH, Bang JH, Park WB, Kim HB, Kim NJ, Oh MD, Lee HS, Choe KW. Bacteremia is a prognostic factor for poor outcome in spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Infect Dis* 2007; 39: 697-702

Chu CM, Chang KY, Liaw YF. Prevalence and prognostic significance of bacterascites in cirrhosis with ascites. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 561-565

van Erpecum KJ. Ascites and spontaneous bacterial peritonitis in patients with liver cirrhosis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2006; 243: 79-84

Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003; 37: 897-901

Fernández J, Navasa M, Gómez J, Colmenero J, Vila J, Arroyo V, Rodés J. Bacterial infections in cirrhosis: epidemiological changes with invasive procedures and norfloxacin prophylaxis. *Hepatology* 2002; 35:140-148

Fleig WE, Grothe W, Lotterer E, Behl S. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP). Retrospective and prospective data from a multicenter study on prevalence, diagnosis and therapy in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 1792-1797

De Franchis R, Salerno F. Pathogenesis of ascites and predictors of resistance to therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 242-247

Gentilini P, Laffi G, La Villa G, Raggi VC. Pathogenetic factors and clinical elements in ascites and hepatorenal syndrome during liver cirrhosis. *Ann Ital Med Int* 1999; 14: 264-284

Gerbes AL, Gülberg V, Sauerbruch T, Wiest R, Appenrodt B, Bahr MJ, Dollinger MM, Rössle M. S3-Leitlinie „Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatorenales Syndrom“. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 2011; 49: 749–779

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; 278: 8869-8872

Guarner C, Runyon BA, Young S, Heck M, Sheikh MY. Intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *J Hepatol* 1997; 26: 1372-1378

Guarner C, Solà R, Soriano G, Andreu M, Novella MT, Vila MC, Sàbat M, Coll S, Ortiz J, Gómez C, Balanzó J. Risk of a first community-acquired spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotics with low ascitic fluid protein levels. *Gastroenterol* 1999; 117: 414-419

Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 2003; 124: 1145-1149

Hoefkens E, Nys K, John JM, Van Steen K, Arijs I, Van der Goten J, Van Assche G, Agostinis P, Rutgeerts P, Vermeire S, Cleynen I. Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Autophagy* 2013; 12: 2046-2055

Hoefs JC, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dis Mon* 1985; 31: 1-48

Hoefs JC, Canawati HN, Sapico FL, Hopkins RR, Weiner J, Montgomerie JZ. Spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatol* 1982; 2: 399-407

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; 411: 599-603

Kuiper JJ, de Man RA, van Buuren HR. Review article: Management of ascites and associated complications in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26: 183-193

Llovet JM, Bartolí R, March F, Planas R, Viñado B, Cabré E, Arnal J, Coll P, Ausina V, Gassull MA. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998; 28: 307-313

Llovet JM, Rodríguez-Iglesias P, Moitinho E, Planas R, Bataller R, Navasa M, Menacho M, Pardo A, Castells A, Cabré E, Arroyo V, Gassull MA, Rodés J. Spontaneous bacterial peritonitis in patients with cirrhosis undergoing selective intestinal decontamination. A retrospective study of 229 spontaneous bacterial peritonitis episodes. *J Hepatol* 1997; 26: 88-95

Merlin D, Si-Tahar M, Sitaraman SV, Eastburn K, Williams I, Liu X, Hediger MA, Madara JL. Colonic epithelial hPepT1 expression occurs in inflammatory bowel disease: transport of bacterial peptides influences expression of MHC class 1 molecules. *Gastroenterol* 2001; 120: 1666-1679

Mowat C, Stanley AJ. Review article: spontaneous bacterial peritonitis--diagnosis, treatment and prevention. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 1851-1859

Musskopf MI, Fonseca FP, Gass J, de Mattos AZ, John JA, de Mello Brandão AB. Prognostic factors associated with in-hospital mortality in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Ann Hepatol* 2012; 11: 915-920

Nakamura N, Lill JR, Phung Q, Jiang Z, Bakalarski C, de Mazière A, Klumperman J, Schlatter M, Delamarre L, Mellman I. Endosomes are specialized platforms for bacterial sensing and NOD2 signalling. *Nature* 2014; 509: 240-244

Nousbaum JB, Cadranet JF, Nahon P, Khac EN, Moreau R, Thévenot T, Silvain C, Bureau C, Nouel O, Pilette C, Paupard T, Vanbiervliet G, Oberti F, Davion T, Jouannaud V, Roche B, Bernard PH, Beaulieu S, Danne O, Thabut D, Chagneau-Derrode C, de Lédinghen V, Mathurin P, Pauwels A, Bronowicki JP, Habersetzer F, Abergel A, Audigier JC, Sapey T, Grangé JD, Tran A. Club Francophone pour l'Etude de l'Hypertension Portale. Association Nationale des Hépatogastroentérologues des Hôpitaux Généraux de France. Diagnostic accuracy of the Multistix 8 SG reagent strip in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology* 2007; 45: 1275-1281

Nischalke HD, Berger C, Aldenhoff K, Thyssen L, Gentemann M, Grünhage F, Lammert F, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U, Appenrodt B. Toll-like receptor (TLR) 2 promoter and intron 2 polymorphisms are associated with increased risk for spontaneous bacterial peritonitis in liver cirrhosis. *J. Hepatol* 2011; 55: 1010-1016

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; 411: 603-606

Ogura Y, Lala S, Xin W, Smith E, Dowds TA, Chen FF, Zimmermann E, Tretiakova M, Cho JH, Hart J, Greenson JK, Keshav S, Nuñez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut* 2003; 52: 1591-1597

Pardo A, Bartolí R, Lorenzo-Zúñiga V, Planas R, Viñado B, Riba J, Cabré E, Santos J, Luque T, Ausina V, Gassull MA. Effect of cisapride on intestinal bacterial overgrowth and bacterial translocation in cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31: 858-863

Piroth L, Pechinot A, Di Martino V, Hansmann Y, Putot A, Patry I, Hadou T, Jaulhac B, Chirouze C, Rabaud C, Lozniewski A, Neuwirth C, Chavanet P, Minello A. Evolving epidemiology and antimicrobial resistance in spontaneous bacterial peritonitis: a two-year observational study. *Infect Dis* 2014; 14: 287

Rimola A, García-Tsao G, Navasa M, Piddock LJ, Planas R, Bernard B, Inadomi JM. Diagnosis, treatment and prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis: a consensus document. International Ascites Club. *J Hepatol* 2000; 32: 142-153

Rincón D, Vaquero J, Hernando A, Galindo E, Ripoll C, Puerto M, Salcedo M, Francés R, Matilla A, Catalina MV, Clemente G, Such J, Bañares R. Oral probiotic attenuates the circulatory disturbances of patients with cirrhosis and ascites. *Liver Int* 2014; 10: 1111

Rosenstiel P, Fantini M, Bräutigam K, Kühbacher T, Waetzig GH, Seegert D, Schreiber S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 2003; 124: 1001-1009

Runyon BA. Practice Guidelines Committee, American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 2009; 49: 2087-2107

Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol* 1994; 21: 792-796

Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis: an explosion of information. *Hepatol* 1988; 8: 171-175

Runyon BA, Canawati HN, Akriviadis EA. Optimization of ascitic fluid culture technique. *Gastroenterol* 1988; 95: 1351-1355

Runyon BA. Low-protein-concentration ascitic fluid is predisposed to spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterol* 1986; 91: 1343-1346

Runyon BA, Morrissey RL, Hoefs JC, Wyle FA. Opsonic activity of human ascitic fluid: a potentially important protective mechanism against spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatol* 1985; 5: 634-637

Runyon BA, Hoefs JC. Culture-negative neutrocytic ascites: a variant of spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatol* 1984; 4: 1209-1211

Saab S, Hernandez JC, Chi AC, Tong MJ. Oral antibiotic prophylaxis reduces spontaneous bacterial peritonitis occurrence and improves short-term survival in cirrhosis: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 993-1001

Simms LA, Doecke JD, Walsh MD, Huang N, Fowler EV, Radford-Smith GL. Reduced alpha-defensin expression is associated with inflammation and not NOD2 mutation status in ileal Crohn's disease. *Gut* 2008; 57: 903-910

Stassen WN, McCullough AJ, Bacon BR, Gutnik SH, Wadiwala IM, McLaren C, Kalhan SC, Tavill AS. Immediate diagnostic criteria for bacterial infection of ascitic fluid. Evaluation of ascitic fluid polymorphonuclear leukocyte count, pH, and lactate concentration, alone and in combination. *Gastroenterol* 1986; 90: 1247-1254

Thévenot T, Cadranel JF, Nguyen-Khac E, Tilmant L, Tiry C, Welty S, Merzoug N. Diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic patients by use of two reagent strips. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 579-583

Vavricka SR, Musch MW, Chang JE, Nakagawa Y, Phanvijhitsiri K, Waypa TS, Merlin D, Schneewind O, Chang EB. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterol* 2004; 127: 1401-1409

Wehkamp J, Stange EF, Fellermann K. Defensin-immunology in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2009; 137-144

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange F. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 2004; 53: 1558-1560

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. T. Sauerbruch für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Dr. med. Beate Appenrodt für die Betreuung der Arbeit und der klinischen Studie.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls ausdrücklich bei Frau Lydia Thyssen, die mit mir zusammen die Patienten in die Studie aufgenommen hat und mit der ich über mehrere Jahre intensiv zusammengearbeitet habe. Ohne Frau Thyssen wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Die Genotypisierung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Studiengruppe von Prof. F. Lammert und Dr. med. F. Grünhage. Für die Nutzung der Laborräumlichkeiten und die wissenschaftliche Unterstützung möchte ich mich sehr bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Molitor vom Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Bonn für den fachlichen Rat und die Hilfe bei der Analyse der Aszitesproben.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dipl. Ing. Felix Lowin und Herrn Christian Herr für die Hilfe bei der Gestaltung der Grafiken.