

Aus den Forschungslaboratorien der Kinderchirurgischen Klinik und Poliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz

**Die Rolle der Gene *CXCL9* und *NR1H2*
bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Kindesalter**

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

vorgelegt von
Stefan Andreas Berkholz
aus Hannover
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Roland Kappler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Andreas Wagner
Priv.-Doz. Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Lacher

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2009

Für meine Eltern in großer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Genetik als medizinisches Forschungsgebiet	1
1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	2
1.2.1 Epidemiologie.....	2
1.2.2 Ätiologie.....	5
1.2.3 Pathogenese und Klinik.....	9
1.2.4 Konservative Therapie	13
1.2.5 Chirurgische Therapie	14
1.3 Ziel der Arbeit.....	16
2 Patienten, Materialien und Methoden	17
2.1 Good clinical practice (Ethikvotum).....	17
2.2 Studienteilnehmer	17
2.3 Probengewinnung	18
2.4 Laborgeräte und Materialien	18
2.5 Chemikalien	19
2.6 Genexpressionsanalyse.....	21
2.6.1 Isolierung von total RNA aus Gewebe.....	21
2.6.2 Aufreinigung der RNA (DNase I-Verdau)	22
2.6.3 cDNA-Synthese.....	23
2.6.4 Genexpressionsarray	24
2.6.5 Quantifizierung der Genexpression	28
2.7 Genotypenanalyse	29
2.7.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	29
2.7.2 Qualitätskontrolle der isolierten DNA.....	30
2.7.3 Bestimmung des optimalen Reaktionsvolumens	33
2.7.4 Genotypisierung mittels TaqMan-Sonden	34
2.7.5 Statistik.....	36
3 Ergebnisse.....	37
3.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse.....	37
3.2 Ergebnisse der DNA-Isolation	40
3.3 Ergebnisse der Reaktionsvolumenbestimmung	41

3.4	Ergebnisse der SNP-Analyse der Allelvariante rs2276886 im Gen <i>CXCL9</i>	42
3.5	Ergebnisse der SNP-Analyse der Allelvariante rs3814055 im Gen <i>NR1I2</i>	44
4	Diskussion	47
4.1	Auswahl der Kandidatengene und <i>NOS2A</i> als Positivkontrolle der Expressionsmessungen.....	47
4.2	Die Bedeutung von <i>CXCL9</i> in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	48
4.2.1	Interaktion von Chemokinen und T-Zellen bei chronischen Entzündungsprozessen.....	48
4.2.2	Bewertung der Genexpression von <i>CXCL9</i> im Kolongewebe von Kindern mit CED.....	51
4.2.3	Bewertung der Allelvariante rs2276886 im Gen <i>CXCL9</i>	52
4.3	Die Bedeutung von <i>NR1I2</i> in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	53
4.3.1	Die Rolle von <i>NR1I2</i> bei Detoxifikationsprozessen des menschlichen Immunsystems.....	53
4.3.2	Bewertung der Genexpression von <i>NR1I2</i> im Kolongewebe von Kindern mit CED.....	55
4.3.3	Bewertung der Allelvariante rs3814055 im Gen <i>NR1I2</i>	56
4.4	Schlussfolgerung.....	57
5	Zusammenfassung	59
	Literaturverzeichnis	61
	Danksagung	83

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Abb. 1.1	Inzidenz der <i>C. ulcerosa</i>	2
Abb. 1.2	Inzidenz des M. Crohn.....	3
Abb. 1.3	Therapeutisches Stufenschema beim M. Crohn.....	13
Abb. 2.1	Gene des Genexpressionsarrays auf einer 96-well-Reaktionsplatte ..	26
Abb. 3.1	Auswertung des Genexpressionsarrays mit 88 Genen bei Kindern mit M. Crohn und Kontrollpersonen	37
Abb. 3.2	Relative Genexpression des Kandidatengens <i>CXCL9</i> im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen	39
Abb. 3.3	Relative Genexpression der Positivkontrolle <i>NOS2A</i> im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen	39
Abb. 3.4	Relative Genexpression des Gens <i>NR112</i> im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen.....	39
Abb. 3.5	Gelelektrophorese zur Ermittlung des besten Primers für die Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Proben	40
Abb. 3.6	Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Proben mit <i>IFNG</i> Primern.....	40
Abb. 4.1	Chemokin-Familien.....	48
Abb. 4.2	Funktionen der Chemokine.....	49
Abb. 4.3	Aktivitätsänderung von T-Lymphozyten bei Bindung von <i>CXCL9</i>	50
Abb. 4.4	Aufbau eines Kernrezeptors	54

Tabellen

Tab. 1.1	Inzidenz der <i>C. ulcerosa</i> und des M. Crohn bei Erwachsenen in Europa	3
Tab. 1.2	Inzidenz der <i>C. ulcerosa</i> und des M. Crohn bei Erwachsenen in Amerika	4
Tab. 1.3	Inzidenz der <i>C. ulcerosa</i> und des M. Crohn bei Erwachsenen in der Asien- und Pazifikregion.....	4
Tab. 1.4	Inzidenz der <i>C. ulcerosa</i> und des M. Crohn bei Erwachsenen in Afrika	5
Tab. 1.5	Inzidenz der <i>C. ulcerosa</i> und des M. Crohn bei Kindern unter 16 Jahren.....	5
Tab. 1.6	Konkordanzraten von CED	7
Tab. 1.7	"Montreal Classification" der CED	12
Tab. 2.1	Reaktionsmix A für eine 96-well-Reaktionsplatte.....	26
Tab. 2.2	PCR-Programm des Genexpressionsarrays.....	27
Tab. 2.3	Primersequenzen der Kandidatengene	28
Tab. 2.4	PCR-Ansatz der Genexpressionsanalyse.....	28

Tab. 2.5	PCR-Ansatz zur DNA-Qualitätskontrolle (1. Arbeitsschritt).....	31
Tab. 2.6	PCR-Programm zur DNA-Qualitätskontrolle	31
Tab. 2.7	PCR-Ansatz zur DNA-Qualitätskontrolle (2. Arbeitsschritt).....	32
Tab. 2.8	Primersequenzen zur DNA-Qualitätskontrolle	32
Tab. 2.9	Reaktionsmix zur Bestimmung des optimalen Reaktionsvolumens	33
Tab. 2.10	PCR-Programm zur Volumenbestimmung.....	33
Tab. 2.11	Reaktionsmix für die Genotypisierungsreaktionen.....	35
Tab. 2.12	PCR-Programm des SNP-Genotyping-Assay	35
Tab. 3.1	Im Genexpressionsarray überexprimierte Gene	38
Tab. 3.2	ct-Werte der Reaktionsvolumenbestimmung	41
Tab. 3.3	Allelverteilung des SNP rs2276886 im Gen <i>CXCL9</i> bei CED, MC, CU und CI	42
Tab. 3.4	Genotypenverteilung des SNP rs2276886 im Gen <i>CXCL9</i> bei CED, MC, CU und CI	43
Tab. 3.5	Allelverteilung des SNP rs2276886 im Gen <i>CXCL9</i> bei Mädchen und Jungen	43
Tab. 3.6	Genotypenverteilung des SNP rs2276886 im Gen <i>CXCL9</i> bei Mädchen und Jungen	43
Tab. 3.7	Subgruppenanalyse des SNP rs2276886 verschiedener Phänotypen bei Kindern mit M. Crohn	44
Tab. 3.8	Allelverteilung des SNP rs3814055 im Gen <i>NR1I2</i> bei CED, MC, CU und CI	45
Tab. 3.9	Genotypenverteilung des SNP rs3814055 im Gen <i>NR1I2</i> bei CED, MC, CU und CI	45
Tab. 3.10	Allelverteilung des SNP rs3814055 im Gen <i>NR1I2</i> bei Mädchen und Jungen	46
Tab. 3.11	Genotypenverteilung des SNP rs3814055 im Gen <i>NR1I2</i> bei Mädchen und Jungen	46
Tab. 3.12	Subgruppenanalyse des SNP rs3814055 verschiedener Phänotypen bei Kindern mit M. Crohn	46

Abkürzungsverzeichnis

AD	Aktivierungsdomäne
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
AF-2 AD	AF-2-Aktivierungsdomäne
bp	Basenpaare
CARD4 (NOD1)	Caspase recruitment domain family member 4 (Nucleotide-binding oligomerization domain protein 1)
CARD15 (NOD2)	Caspase recruitment domain-containing protein 15 (Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2)
CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CI	Colitis indeterminata
ct	cycle threshold
CU	Colitis ulcerosa
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
CXCL11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
CYP	Cytochrom P-450
CYP2B	Cytochrome P-450 subfamily 2B
CYP2C	Cytochrome P-450 subfamily 2C
CYP3A	Cytochrome P-450 subfamily 3A
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DLG5	Discs large homolog 5 (Drosophila)
FOXA2	Forkhead box A2
g	Erdschwerebeschleunigung
HLA DRB1*103	Major histocompatibility complex class II DR β 1
IFNG	Interferon- γ
IGF1	Insulin-like growth factor 1 (Somatomedin C)
IGF2	Insulin-like growth factor 2 (Somatomedin A)
IL1A	Interleukin-1 α
IL1B	Interleukin-1 β

IL6	Interleukin-6
IPAA	Ileopouchanale Anastomose
JAK3	Janus kinase 3
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KI	Konfidenzintervall
LBD	Liganden-Bindungsdomäne
M	Molar
MC	Morbus Crohn
MDR1	Multiple drug resistance gene 1
µg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NaN	not a numer (keine Zahl)
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NOS	Nitric oxide synthase
NOS1 (nNOS)	neuronal Nitric oxide synthase
NOS2 (iNOS)	inducible Nitric oxide synthase
NOS2A	Nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)
NOS3 (eNOS)	endothelial Nitric oxide synthase
NR1I2 (PXR)	Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2 (Nuclear pregnane X receptor)
NTC	no template control (Negativkontrolle)
OATP2	Organic anion transporter 2
OCTN1	Organic cation transporter 1
OCTN2	Organic cation transporter 2
OR	odds ratio (Chancenverhältnis)
PCR	Polymerase chain reaction
PMID	PubMed Identifier
PNET	Primitiv neuroektodermaler Tumor
PSC	primär sklerosierende Cholangitis

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SNP	Single nucleotid polymorphism
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFA	Tumornekrosefaktor- α
Vol.	Volumen

1 Einleitung

1.1 Genetik als medizinisches Forschungsgebiet

Das menschliche Genom besteht aus etwa 3 Milliarden Basenpaaren. Im Jahr 1990 wurde das Human Genome Project zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms ins Leben gerufen. Bis 2001 war dieses Projekt zu 90 % fertiggestellt (Lander ES et al. (2001)). Bis zum Jahr 2004 konnte die Sequenzierung auf 99 % des Genoms erweitert werden, jedoch bestehen weiterhin über 300 Regionen mit unbekannter Sequenz (International Human Genome Sequencing Consortium (2004), Bovee D et al. (2008)).

Die molekulargenetische Untersuchung von Erkrankungen stellt für die Medizin eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieverfahren dar. Öffentliche Datenbanken, in denen Genomsequenzen erfasst werden, verdoppeln ihren Umfang in einem Zeitraum von etwa achtzehn Monaten (Stähler P et al. (2006)). Dieser rasante Erkenntnisgewinn hat die Suche nach krankheitsrelevanten Kandidatengenen vereinfacht. Hierbei handelt es sich um Gene, die durch eine Modifikation ihrer Ursprungsform einen pathologischen Effekt auslösen. Solche Modifikationen können u. a. Single Nucleotid Polymorphismen (SNPs) im Genom sein.

Bei SNPs handelt es sich um einen punktuellen Austausch der Nukleotide Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin in der DNA-Sequenz, der definitionsgemäß bei mindestens 1 % einer Population auftritt (Pschyrembel (2004)). Je nach Position eines SNPs in der Basenabfolge kann die Struktur und die Funktion eines Proteins verändert sein und schwere Erkrankungen hervorrufen (Syvänen AC (2001)).

SNPs stellen die häufigsten Polymorphismen im menschlichen Genom dar. Alleine beim Menschen sind über 10 Millionen SNPs bekannt, und fast täglich werden neue beschrieben (Xu H et al. (2005)). Damit gehören SNPs zu den häufigsten Makern genetischer Assoziationsstudien (Morcillo-Suarez C et al. (2008)).

1.2 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

1.2.1 Epidemiologie

Die beiden Hauptformen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) sind die C. ulcerosa (CU) und der M. Crohn (MC). Die Inzidenzraten dieser Erkrankungen variieren sowohl zwischen verschiedenen Ländern als auch innerhalb von Bevölkerungsgruppen eines Landes (Tab. 1.1 – Tab. 1.4). Länder mit hoher Inzidenz und Prävalenz sind Industrienationen wie Nordeuropa und Nordamerika (Abb. 1.1, Abb. 1.2 bzw. Tab. 1.1 – Tab. 1.4). Allerdings zeigte sich im Verlauf der letzten Jahre auch in den bisher weniger betroffenen Regionen ein Inzidenzanstieg (Loftus EV Jr. (2004)). Ein direkter Vergleich zwischen einzelnen Ländern ist aufgrund der unterschiedlichen Studienprotokolle (retrospektive und prospektive Studien, gepoolte Untersuchungsgruppen und variable Beobachtungszeiträume) schwierig.

Bei Kindern unter 16 Jahren liegt je nach Land die Inzidenz der C. ulcerosa zwischen 0,96 und 3,67 und des M. Crohn zwischen 1,95 und 4,9 pro 100.000 Kinder (Tab. 1.5) (Pinsk V et al. (2007); Perminow G et al. (2006); Hildebrand H et al. (2003)).

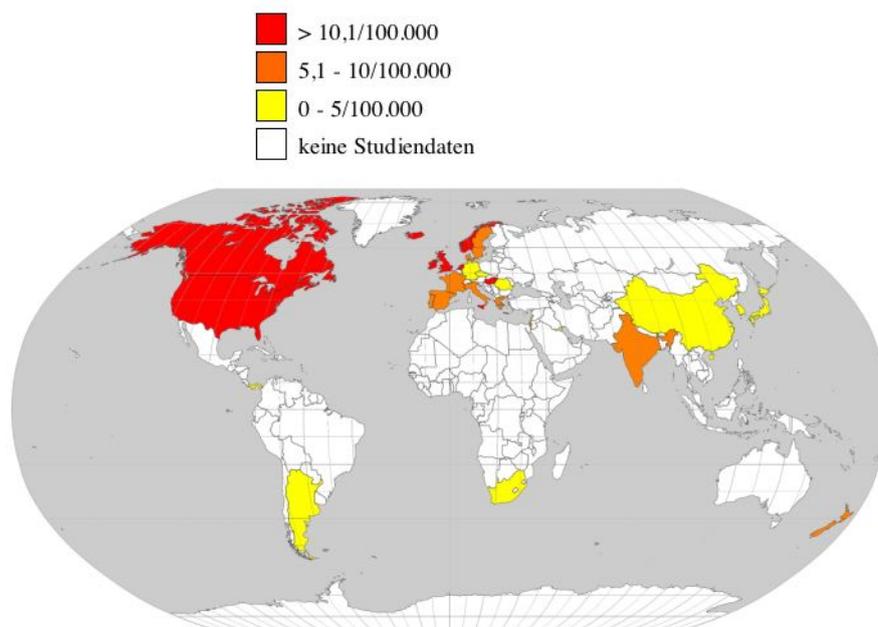


Abb. 1.1 Inzidenz der C. ulcerosa (Weltkarte nach www.mygeo.info (2008))

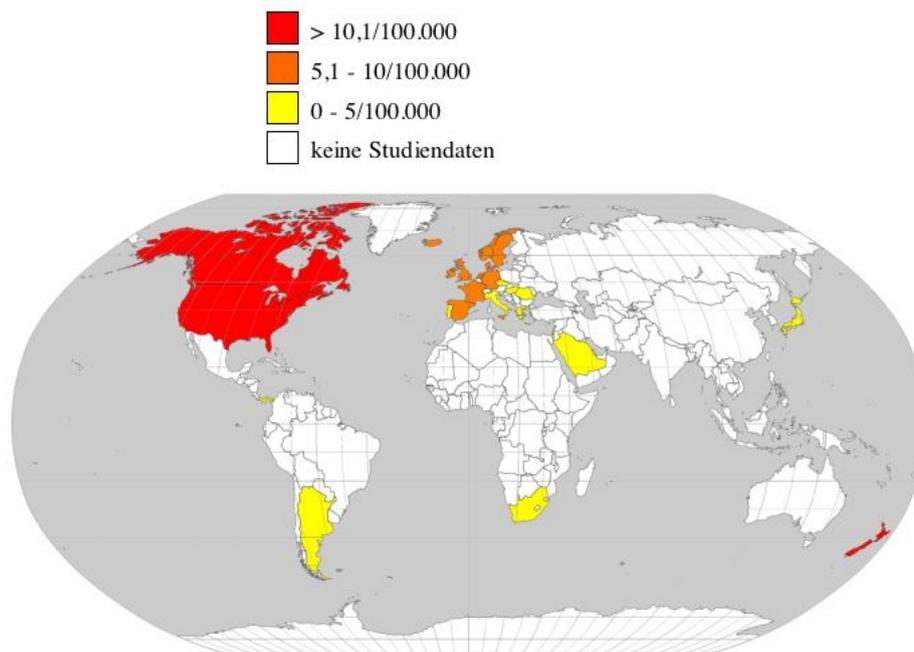


Abb. 1.2 Inzidenz des M. Crohn (Weltkarte nach www.mygeo.info (2008))

Tab. 1.1 Inzidenz der C. ulcerosa und des M. Crohn bei Erwachsenen in Europa

Land	Inzidenz CU (pro 100.000)	Inzidenz MC (pro 100.000)	Quelle
Dänemark	9,8	7,3	Shivananda S et al. (1996)
Deutschland	2,4 – 3,9	4,9 – 6,6	Timmer A, Goebell H (1999); Timmer A et al. (1999); Ott C et al. (2008)
Frankreich	6,7	9,2	Shivananda S et al. (1996)
Griechenland	9,3	0,9	Shivananda S et al. (1996)
Irland	15,2	5,2	Shivananda S et al. (1996)
Island	24,5	7,8	Shivananda S et al. (1996)
Italien	8,6 – 9,1	2,5 – 4,4	Shivananda S et al. (1996)
Kreta	19,3	4,8	Shivananda S et al. (1996)
Niederlande	14,1	9,2	Shivananda S et al. (1996)
Norwegen	15,6	7,9	Shivananda S et al. (1996)
Portugal	1,6 – 6,6	2,6 – 4,2	Shivananda S et al. (1996)
Rumänien	0,76 – 1,49	0,38 – 0,88	Gheorghe C et al. (2004)

Schweden	6,3	4,3 – 6,8	Lindberg E, Järnerot G (1991); Stewénius J et al. (1995)
Sizilien	11	6,6	Shivananda S et al. (1996)
Spanien	7,4 – 9,8	5,1 – 5,2	Shivananda S et al. (1996)
Tschechische Republik	0 – 4,04	0 – 4,44	Kolek A et al. (2004)
Ungarn	1,66 – 11,01	0,41 – 4,68	Lakatos L et al. (2003)
Vereinigtes Königreich	10,0 – 15,3	3,8 – 5,6	Shivananda S et al. (1996)

Tab. 1.2 Inzidenz der C. ulcerosa und des M. Crohn bei Erwachsenen in Amerika

Land	Inzidenz CU (pro 100.000)	Inzidenz MC (pro 100.000)	Quelle
Argentinien	2,2	1	Linares de la Cal JA et al. (1999)
Kanada	9,9 – 19,5	8,8 – 20,2	Blanchard JF et al. (2001); Bernstein CN et al. (2006); Lowe AM et al. (2008)
Panama	1,2	0	Linares de la Cal JA et al. (1999)
USA	3,1 – 12,0	2,3 – 14,6	Loftus EV Jr et al. (2002); Loftus CG et al. (2007); Herrinton LJ et al. (2008)

**Tab. 1.3 Inzidenz der C. ulcerosa und des M. Crohn bei Erwachsenen in der Asien-
und Pazifikregion**

Land	Inzidenz CU (pro 100.000)	Inzidenz MC (pro 100.000)	Quelle
China/Hongkong	0,29 – 1,2	keine Studien	Lok KH et al. (2007)
Indien	6,02	keine Studien	Sood A et al. (2003)
Israel	9,1	4,4	Shivananda S et al. (1996)
Japan	1,95	0,5 – 1,2	Morita N et al. (1995); Yao T et al. (2000)
Kuwait	2,8	keine Studien	Al-Shamali MA et al. (2003)
Libanon	4,1	1,4	Abdul-Baki H et al. (2007)
Neuseeland	7,5	16,3	Gearry RB et al. (2006)
Saudi-Arabien	keine Studien	0,32 – 1,66 (mean: 0,94)	Al-Ghamdi AS et al. (2004)
Südkorea	0,2 – 1,23 (mean: 0,68)	keine Studien	Yang SK et al. (2000)

Tab. 1.4 Inzidenz der C. ulcerosa und des M. Crohn bei Erwachsenen in Afrika

Land	Inzidenz CU (pro 100.000)	Inzidenz MC (pro 100.000)	Quelle
Südafrika	0,6 – 5,0	0,3 – 2,6	Wright JP et al. (1986)

Tab. 1.5 Inzidenz der C. ulcerosa und des M. Crohn bei Kindern unter 16 Jahren

Land	Inzidenz CU (pro 100.000)	Inzidenz MC (pro 100.000)	Quelle
Kanada *	0,96	3,69	Pinsk V et al. (2007)
Norwegen	2,05 – 3,67	1,95 – 3,64	Perminow G et al. (2006)
Schweden	2,2	4,9	Hildebrand H et al. (2003)

* nicht-südasiatische Bevölkerung

In einer US-amerikanischen Studie zeigte sich über einen Zeitraum von sechzig Jahren die höchste Inzidenzrate von CED bei jungen Erwachsenen (CU: 13,9 und MC: 13,7 pro 100.000 Personenjahren) mit einem mittleren Erkrankungsalter für die C. ulcerosa von 33 Jahren und für den M. Crohn von 29 Jahren (Loftus CG et al. (2007)).

Bei 15 – 25 % der Patienten mit CED wird die Diagnose im Kindesalter gestellt. Hierbei ist über die Hälfte (63 %) der Kinder bei Diagnosestellung jünger als zwölf Jahre (Kim SC & Ferry GD (2004)). Zwischen dem Auftreten erster Symptome und der Diagnosestellung vergehen bei Kindern im Mittel fünf Monate, und in 10 – 15 % der Fälle kann zu Beginn der Erkrankung nicht zwischen dem M. Crohn und der C. ulcersa differenziert werden. In diesen Fällen wird die Erkrankung als C. indeterminata (CI) bezeichnet (Abdel-Hady M & Bunn SK (2004)).

1.2.2 Ätiologie

Als Erkrankungsursache von CED wird ein multimodales Zusammenspiel genetischer, immunologischer und äußerer Umweltfaktoren angenommen. Dabei führt wahrscheinlich bei genetisch prädisponierten Individuen eine inadäquate Immun-

antwort auf exogene Stimulationen zu einer überschießenden Entzündungsreaktion im Darm (Torres MI & Rios A (2008)).

Im Zusammenhang mit CED ist eine große Anzahl exogener Ursachen untersucht und teilweise unter dem Begriff der Hygienehypothese zusammengefasst worden. Diese Hypothese besagt, dass ein höherer Hygienestandard, Impfungen und der verbreitete Einsatz von Antibiotika mit konsekutiv geringerer Keimexposition und niedrigeren Infektionsraten im Kindesalter zu Allergien und Autoimmunerkrankungen führen können (Yazdanbakhsh M et al. (2002)). Studienergebnisse zeigen, dass ein frühkindlicher Kontakt zu Tieren auf dem Bauernhof, ähnlich wie bei juvenilen Allergien, einen risikosenkenden Einfluss auf die Entwicklung von CED haben könnte (Radon K et al. (2007)). Eine signifikante Assoziation der Hygienehypothese mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bisher aber nicht gesichert. Methodische Studienfehler und ambivalente Untersuchungsergebnisse machen eine kritische Überprüfung dieses Zusammenhangs erforderlich (Koloski NA et al. (2008)).

Ein anschauliches Beispiel für die Schwierigkeit eines wissenschaftlichen Nachweises des Einflusses von externen Faktoren auf CED ist die Entdeckung einer bis dahin unklassifizierten Mycobacteriumspezies im Blut von Patienten mit M. Crohn im Jahr 1984 (Chiodini RJ et al. (1984)). Ein daraufhin formulierter potentieller Zusammenhang zwischen den Bakterienstämmen und dem M. Crohn wurde in der Folgezeit vielfach untersucht, konnte jedoch bis heute weder eindeutig bestätigt noch widerlegt werden (Feller M et al. (2007)).

Saisonal auftretende Faktoren wie Infektionskrankheiten im frühen Kindesalter erhöhen das Risiko für CED nach aktuellem Wissen wahrscheinlich nicht (Sonnenberg A. (2008)). Bakterielle und virale Infektionen sind somit keine direkten Krankheitsauslöser für den M. Crohn und die *C. ulcerosa*, gelten aber als Modulatoren, welche den Zeitpunkt des Ausbruchs und den Verlauf der Erkrankungen beeinflussen können (Irving PM & Gibson PR (2008)).

Einen protektiven Einfluss hinsichtlich der Entwicklung einer CED scheint die Ernährung eines Säuglings mit Muttermilch zu haben (Klement E et al. (2004)). Es konnte auch gezeigt werden, dass Nikotinkonsum das Erkrankungsrisiko für die *C. ulcerosa* senkt oder den Verlauf begünstigt, während ein gegenteiliger Effekt für

den M. Crohn beschrieben wurde (Cosnes J (2008)). Weitere Studien halten einen risikoe erhöhenden Einfluss durch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva für möglich (Cornish JA et al. (2008)). Ein verändertes Risikoprofil nach erfolgter Appendektomie wird kontrovers diskutiert. Die vorliegenden Studien zeigen diesbezüglich widersprüchliche Daten (Frisch M et al. (2001); Cosnes J et al. (2002), Kaplan GG et al. (2007); Frisch M et al. (2009)).

Weiterhin scheinen Patienten mit CED häufiger unter Depressionen und Angststörungen zu leiden (Walker JR et al. (2008)). Eine Studie zum Einfluss psychischer Faktoren zeigte außerdem erhöhte Rezidivraten des M. Crohn bei Patienten, die erhöhtem Stress ausgesetzt waren (Bitton A et al. (2008)).

Am besten ist der Einfluss genetischer Faktoren auf CED untersucht. Vielfach wurde der Nachweis mittels Familienanalysen und Zwillingsstudien geführt, da es ein familiär gehäuftes Auftreten und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko von erstgradig verwandten Personen gibt (Cipolla C et al. (1996)). Bei eineiigen Zwillingen liegen die Konkordanzraten bei der C. ulcerosa zwischen 16 – 19 % und beim M. Crohn zwischen 20 – 50 %. Die Konkordanzraten zweieiiger Zwillinge betragen bei der C. ulcerosa und beim M. Crohn jeweils 0 – 7 % (Tab. 1.6). Das alterskorrigierte Risiko für erstgradig Verwandte, eine CED zu entwickeln, liegt für die C. ulcerosa bei 1,6 % und für den M. Crohn bei 5 %. Sind beide Eltern erkrankt, steigt das Risiko für ihre Kinder auf über 30 % (Halme L et al. (2006)). Die höheren Konkordanzraten bei Zwillingen mit M. Crohn lassen vermuten, dass der genetische Einfluss bei dieser Erkrankung größer als bei der C. ulcerosa ist (Spehlmann ME et al. (2008)).

Tab. 1.6 Konkordanzraten von CED nach Halme L et al. (2006)

	C. ulcerosa	M. Crohn
Monozygote Zwillinge	16 – 19 %	20 – 50 %
Dizygote Zwillinge	0 – 7 %	0 – 7 %

Bereits seit langem ist eine Vielzahl von Genvarianten bekannt, die gehäuft im Zusammenhang mit CED auftreten und daher als Suszeptibilitätsgene bezeichnet werden. Während einige Suszeptibilitätsgene hinsichtlich der *C. ulcerosa* und des M. Crohn gleichermaßen prädisponieren, konnte für andere nur eine Assoziation mit einer der beiden Erkrankungen gefunden werden (Ahmad T et al. (2001)).

Das erste Gen, für das ein direkter Zusammenhang mit M. Crohn nachgewiesen wurde, ist Caspase recruitment domain-containing protein 15 (**CARD15**), welches auf Chromosom 16q12 kartiert ist (Hugot JP et al. (1996); Hugot JP et al. (2001); OMIM (2008)). Drei verschiedene Polymorphismen (R702W im Exon 4, G908R im Exon 8 und 1007fs im Exon 11) sind unabhängig voneinander mit M. Crohn assoziiert, und die Allelvarianten G908R und 1007fs zeigen zusätzlich eine Assoziation mit einem schweren Krankheitsverlauf (Lesage S et al. (2002); Oostenbrug LE et al. (2006)). Damit ist *CARD15* bis heute das wichtigste Suszeptibilitätsgen für CED und der Zusammenhang von M. Crohn und *CARD15* gehört zu den am besten untersuchten genetischen Krankheitsassoziationen ((Cho (2006); Walters TD & Silverberg MS (2006)). Neben *CARD15* gilt auch die genetische Suszeptibilität von Autophagy 16-like 1 (**ATG16L1**) und Interleukin 23 receptor (**IL23R**) mit M. Crohn als gesichert und wurde in genomweiten Assoziationsstudien mehrfach reproduziert (Duerr RH et al. (2006); Hampe J et al. (2007); Rioux JD et al. (2007); Wellcome Trust Case Control Consortium (2007)). Weitere Suszeptibilitätsgene sind u. a. Discs large homolog 5 (Drosophila) (**DLG5**), Major histocompatibility complex class II DR β 1 (**HLA DRB1*103**), Multiple drug resistance gene 1 (**MDR1**), Caspase recruitment domain family member 4 (**CARD4**), Organic cation transporter 1 und 2 (**OCTN1, OCTN2**) und Toll-like receptor 4 (**TLR4**) (Weersma RK et al. (2007)). In einer aktuellen Metaanalyse wurden weiterhin 21 neue mit M. Crohn assoziierte Genloci beschrieben (Barrett JC et al. (2008)).

Vielen dieser Kandidatengene ist gemeinsam, dass sie eine Rolle bei Abwehrmechanismen wie der Erkennung von Bakterien oder Pathogenen (*CARD4*, *CARD15*), der Aufrechterhaltung der epithelialen Barrierefunktion (*DLG5*, *TLR4*) und der Entgiftungsfunktion (*MDR1*) spielen (Gaya DR et al. (2006)).

Kinder weisen selten eine vergleichbare Komorbidität wie erwachsene Patienten auf, wodurch sich die Krankheitsgeschichte von CED besser zurückverfolgen lässt (de

Mesquita MB et al. (2008)). Außerdem sind sie seltener und kürzer externen Einflüssen wie Medikamenteneinnahme und Nikotinkonsum ausgesetzt. Deshalb wird bei Kindern ein größerer Stellenwert genetischer Faktoren und eine höhere Frequenz von Genmutationen in der Pathogenese von CED angenommen. Vor diesem Hintergrund wurde auch eine im Vergleich zu Erwachsenen signifikante Häufung von SNPs in den Genen *CARD15* und *OCTN* bei Kindern mit M. Crohn nachgewiesen. Der SNP R702W in *CARD15* zeigte außerdem beim M. Crohn eine signifikante Assoziation mit einer frühen Krankheitsmanifestation (de Ridder L et al. (2007)).

1.2.3 Pathogenese und Klinik

Beim M. Crohn handelt es sich um eine chronisch granulomatöse Entzündungsreaktion, die den gesamten Gastrointestinaltrakt befallen kann. Typischerweise breitet sich die Erkrankung diskontinuierlich aus, sodass zwischen den erkrankten Darmabschnitten auch gesunde Bereiche (skip lesions) liegen. Die Darminflammation verteilt sich häufig in einem makroskopisch als "Pflastersteinrelief" beschriebenen Muster und betrifft alle Wandschichten des Darmes (transmurale Infiltration). Die häufigste Lokalisation ist das terminale Ileum, weshalb der M. Crohn auch als "Ileitis terminalis" bezeichnet wird. Bei längerem Krankheitsverlauf kommt es häufig zur Ausbildung von Abszessen, Strikturen und Fisteln (Baumgart DC & Sandborn WJ (2007)). Im Unterschied zu Erwachsenen zeigt sich bei Kindern seltener ein isolierter Befall des terminalen Ileums, wohingegen ein Befall des Dickdarms und des oberen Gastrointestinaltrakts häufiger ist (Nieuwenhuis EE & Escher JC (2008)).

In bis zu 25 % der Fälle treten beim M. Crohn extraintestinale Krankheitsmanifestationen auf. Hierzu zählen Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems (MC: 22 %, CU: 11 %), der Atemwege (v. a. Asthma bronchiale) und Erkrankungen der Haut wie Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum (MC: bis 20 %). Ebenfalls werden Augenerkrankungen wie Episkleritis und Uveitis (MC: bis 10 %) und psychiatrische Erkrankungen wie Depression beobachtet (Ephgrave K (2007)). Insbesondere Kinder und Jugendliche können durch krankheitsbedingte

Ausfälle unter sozialer Ausgrenzung, schulischem Leistungsabfall und Schuldgefühlen leiden (Nicholas DB et al. (2007)).

Die *C. ulcerosa* ist ebenfalls eine entzündliche Erkrankung der Darmschleimhaut. Im Gegensatz zum *M. Crohn* breitet sich die Entzündung aber kontinuierlich entlang der Dickdarmschleimhaut von distal nach proximal aus und bleibt fast ausschließlich auf das Rektum und Kolon begrenzt. Ein langjähriger Krankheitsverlauf kann zu einem Verstreichen der typischen makroskopisch sichtbaren Haustrierung des Kolons führen. Die Schleimhautläsionen bleiben bei der *C. ulcerosa* auf die Mukosa und Submukosa begrenzt. Häufig finden sich Kryptenabszesse und Pseudopolypen (Thoreson R & Cullen JJ (2007)).

In einigen Fällen kann es zum Übergreifen der Erkrankung auf das distale Ileum kommen. Dies wird als "backwash ileitis" bezeichnet. Gelegentlich wird die "backwash ileitis" auch als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben, dessen Abgrenzung zum Ileumbefall beim *M. Crohn* aber sehr schwierig ist (Goldstein N & Dulai M (2006)). Wenn bei Kindern die Diagnose einer *C. ulcerosa* gestellt wird, befindet sich die Erkrankung in bis zu 90 % der Fälle bereits in einem fortgeschrittenen Stadium (Pankolitis). Eine isolierte Proktitis ist bei Kindern seltener als bei Erwachsenen (Nieuwenhuis EE & Escher JC (2008)).

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen verlaufen in der Regel schubweise, unterbrochen von symptomarmen oder symptomfreien Intervallen (Remission). Die häufigsten klinischen Beschwerden sind eine erhöhte Stuhlfrequenz und Diarrhoe. Daneben bestimmen häufig krampfartige Bauchschmerzen und ein Gewichtsverlust das klinische Bild. Rektale Blutungen und blutige Diarrhoen können ebenfalls auftreten. Sie sind bei der *C. ulcerosa* häufiger als beim *M. Crohn* (Sands BE (2004)).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ist bei 85 % der betroffenen Kinder bereits eine eingeschränkte körperliche Entwicklung und eine Gewichtsabnahme (CU: 65 %, MC: 85 %) feststellbar (Diefenbach KA & Breuer CK (2006)). Grund für die körperliche Entwicklungsverzögerung ist eine Malabsorption von Kohlenhydraten, Proteinen, Fetten, Mineralien und fettlöslichen Vitaminen. Durch die unzureichende Aufnahme von Vitamin-D und eine gestörte Kalziumresorption kommt es zu Osteoporose. Der Mangel an Eisen, Folsäure und Vitamin B₁₂ verursacht eine

Anämie (Kappelman MD & Bousvaros A (2008)). Durch die Malnutrition werden außerdem proinflammatorische Zytokine freigesetzt, welche die physische Entwicklung stören können. Zu diesen Entzündungsmediatoren zählen Interleukin-1 β (IL1B), Interleukin-6 (IL6) und Tumornekrosefaktor- α (TNFA). Sie beeinflussen die Interaktion zwischen dem Wachstumshormon (growth hormone), dem Insulin-like growth factor (IGF1) und den Gonadotropinen (Ahmed SF et al. (2007)). Hierbei scheint IL6 eine supprimierende Wirkung auf IGF1 zu haben und TNFA die Differenzierung und Reifung von Chondrozyten zu behindern. Dieser negative Effekt beim Knochenaufbau wird durch therapeutisch exogen zugeführte Kortikosteroide zusätzlich verstärkt (Ballinger A (2002)).

Patienten mit CED unterliegen einem erhöhten Risiko für Schleimhautdysplasien und gastrointestinale Karzinome. Die kumulative Wahrscheinlichkeit, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, steigt mit zunehmender Erkrankungsdauer von 2 % (CU) bzw. 2,9 % (MC) **nach 10 Jahren**, über 8 % (CU) bzw. 5,6 % (MC) **nach 20 Jahren**, auf 18 % (CU) bzw. 8,3 % (MC) **nach 30 Jahren**. Auch die Lokalisation und die Länge des befallenen Darmabschnittes, ein junges Erkrankungsalter, eine familiäre Disposition hinsichtlich kolorektaler Karzinome und eine gleichzeitig bestehende primär sklerosierende Cholangitis (PSC) erhöhen das Entartungsrisiko (Zisman TL & Rubin DT (2008)).

Aufgrund der unterschiedlichen klinischen Ausprägung von CED wurde unter Berücksichtigung verschiedener Krankheitsmerkmale versucht, eine Klassifikation zu erarbeiten. Die "Vienna Classification" von 1998 legte als Hauptkriterien das Erkrankungsalter, die anatomische Lokalisation und den Krankheitsverlauf fest. Diese Klassifizierung wurde in der "Montreal Classification" von 2005 im Wesentlichen beibehalten, jedoch um weitere Kriterien ergänzt (Gasche C et al. (2000); Silverberg MS et al. (2005); Satsangi J et al. (2006)). Eine Übersicht bietet Tab. 1.7. Während die Merkmale **L**, **B** und **E** in erster Linie zur Beurteilung des M. Crohn dienen, beschreiben die Merkmale **E** und **S** Ausprägungen der C. ulcerosa (Tab. 1.7). Um eine möglichst einheitliche und schnelle Diagnosefindung speziell bei Kindern zu ermöglichen, wurden weiterhin die "Porto Kriterien" postuliert. Sie beinhalten bei Verdacht auf CED eine frühe Überweisung in die pädiatrische Gastroenterologie, eine gezielte Anamnese und körperliche Untersuchung, verschiedene labortechnische Testverfahren, eine Ileokoloskopie und Gastroskopie

mit histologischer Auswertung von Biopsien aus entzündeten und gesunden Schleimhautarealen und eine radiologische Abklärung (IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (2005)).

Tab. 1.7 "Montreal Classification" der CED modifiziert nach Silverberg MS et al. (2005); Satsangi J et al. (2006)

Alter bei Erstdiagnose (A)

- A1 ≤ 16 Jahre
- A2 17 – 40 Jahre
- A3 > 40 Jahre

Lokalisation (L)

- L1 terminales Ileum
- L2 Kolon
- L3 Ileokolon
- L4 oberer Gastrointestinaltrakt

Modifikator: oberer Gastrointestinaltrakt

- L1 + L4 terminales Ileum + oberer Gastrointestinaltrakt
- L2 + L4 Kolon + oberer Gastrointestinaltrakt
- L3 + L4 Ileokolon + oberer Gastrointestinaltrakt

Krankheitsverlauf (B)

- B1 * nicht stenosierend,
nicht penetrierend
- B2 stenosierend
- B3 penetrierend

Modifikator: perianaler Befall (p)

- B1p nicht stenosierend, + perianal
nicht penetrierend
- B2p stenosierend + perianal
- B3p penetrierend + perianal

Krankheitsausbreitung der CU (E)

- E1 ulzerierende Proktitis
- E2 linksseitige CU (distal)
- E3 extensive CU (Pankolitis)

Krankheitsschweregrad der CU (S)

- S0 klinische Remission
- S1 milder Verlauf
- S2 moderater Verlauf
- S3 schwerer Verlauf

* Empfehlung: für 5 – 10 Jahre ab dem Zeitpunkt der Diagnose gilt B1 als "vorläufig"

1.2.4 Konservative Therapie

Die Grundzüge der medikamentösen Therapie bestehen in einer aggressiven Behandlung akuter Krankheitsschübe und in der Unterstützung eines möglichst langen Remissionserhalts (Rezidivprophylaxe). Bei einem akuten Schub und in der Initialtherapie gehören **Kortikosteroide** trotz starker Nebenwirkungen zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten bei Kindern und erwachsenen Patienten (Benchimol EI et al. (2008); Bossa F et al. (2008)). Zum Remissionserhalt bzw. zur Rezidivprophylaxe können bei Kindern und Erwachsenen entzündungshemmende **5-Aminosalicylate**, **Antibiotika** und **Immunsuppressiva**, wie der Purin-Antimetabolit Azathioprin, die direkt wirksame Form 6-Mercaptopurin und der Folsäureantagonist Methotrexat, eingesetzt werden (Tamboli CP (2007)).

Für schwere Verläufe oder bei einem Versagen von Kortikosteroiden stehen **Biologika** (biologic agents) wie monoklonale Antikörper beispielsweise gegen TNFA (Infliximab, Adalimumab) zur Verfügung, wobei Adalimumab nur in der Behandlung des M. Crohn zugelassen ist (Nikolaus S & Schreiber S (2008)). Weitere Antikörper wie Natalizumab, ein monoklonaler IgG₄-Antikörper gegen Integrin- α -4, und Visilizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen das CD3-Antigen auf aktivierten T-Zellen, werden gegenwärtig im Rahmen klinischer Studien evaluiert (Summers RW (2007)). Die Wertigkeit der einzelnen Substanzgruppen kann anhand eines Stufenschemas verdeutlicht werden (Abb. 1.3). Allerdings wird diese Abstufung mittlerweile auch kritisch beurteilt und ein früher Einsatz hochpotenter Wirkstoffe unter Abwägung der meistens höheren Toxizität diskutiert (Baumgart DC (2009)).

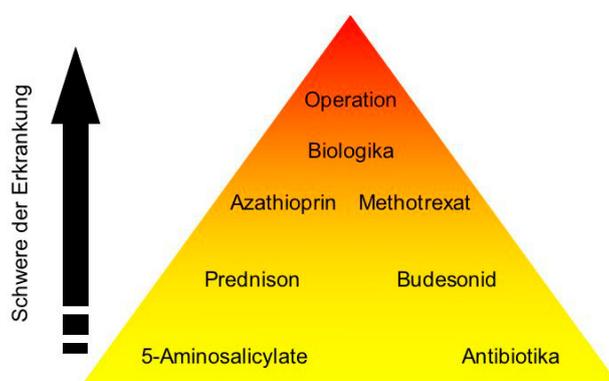


Abb. 1.3 Therapeutisches Stufenschema beim M. Crohn nach Tamboli CP (2007)

Sehr gute Erfolge bei der Therapie eines akuten Entzündungsschubs bei Kindern mit M. Crohn kann die **primäre enterale Ernährungstherapie** mit Trink- und Sondennahrung erreichen. Im Vergleich zur systemischen Kortikosteroidtherapie kommt es bei der Ernährungstherapie nur in geringem Maß zu Nebenwirkungen bei gleichzeitig höherer Lebensqualität für die Patienten (Koletzko S & Siegart T (2004)).

Eine weitere konservative Therapieoption stellen **Probiotika** dar. Dabei handelt es sich um lebende Mikroorganismen (z. B. Lactobacillus), die nach Aufnahme in den menschlichen Gastrointestinaltrakt durch Inhibition pathogener Bakterien und Modulation der intestinalen Epithelfunktion und Zytokinproduktion einen therapeutischen Effekt erzielen können (Jones JL & Foxx-Orenstein AE (2007)).

Davon abzugrenzen sind die **Prebiotika**, eine Gruppe unverdaulicher Oligosaccharide, welche durch Stimulation apathogener Darmbakterien, Anregung der intestinalen Schleimproduktion, Erhöhung antiinflammatorischer und Verminderung proinflammatorischer Zytokine einen therapeutischen Effekt erzielen können. Zur besseren Bewertung des therapeutischen Nutzens von Probiotika und Prebiotika sind weiterführende Studien erforderlich (Looijer-van Langen MA & Dieleman LA (2008)).

Ebenfalls einer weitergehenden Beurteilung bedarf der Einsatz von **Helminthen** für die Therapie von CED. Erste erfolgversprechende Studien mit den Nematoden *Trichuris suis* und *Necator americanus* wurden bereits durchgeführt (Summers RW (2007)).

1.2.5 Chirurgische Therapie

Aufgrund von Komplikationen ist bei 70 – 90 % der Patienten mit **M. Crohn** im Verlauf der Erkrankung eine chirurgische Interventionen erforderlich (Polle SW et al. (2005)). Notfallindikationen zur Operation bestehen bei freier Darmperforation und starken intraabdominellen Blutungen. Maligne Entartungen und ein Versagen der konservativen Therapie stellen bei Erwachsenen elektive Indikationen dar (Roses RE & Rombeau JL (2008)). Im Kindesalter zählt ebenfalls ein Versagen der konservativen Therapie mit anhaltender Symptomatik wie Wachstumsstörun-

gen zu den häufigsten Gründen (47 %) für eine operative Intervention, gefolgt von intraabdominellen Abszessen und Perforationen (16 %), Obstruktionen (16 %), Fistelbildungen (14 %), schweren Blutungen (4 %) und Appendektomien (3 %) (Patel HI et al. (1997)).

Als operatives Verfahren kommt beim M. Crohn die segmentale Darmresektion des entzündlich veränderten Darmabschnittes zur Anwendung. Um das Risiko eines Kurzdarmsyndroms zu verringern, wird von vielen Chirurgen bei Dünndarmbefall die Strikturplastik einer Resektion vorgezogen (Strong SA (2002)). Da gezeigt werden konnte, dass der Abstand des Resektionsabstandes zum makroskopisch entzündeten Darm keinen negativen Einfluss auf die Rezidivrate hat, ist beim M. Crohn eine sparsame Resektion anzustreben (Fazio VW et al. (1996)). Neben der offenen Operationstechnik können Darmresektionen auch laparoskopisch durchgeführt werden. Beide Verfahren gelten als gleichwertig hinsichtlich der Patientenzufriedenheit, obgleich für das laparoskopische Vorgehen eine geringere Morbidität, kürzere Krankenhausaufenthalte und insgesamt geringere Kosten nachgewiesen werden konnten (Maartense S et al. (2006)).

Patienten mit **C. ulcerosa** werden in 30 – 40 % der Fälle im Verlauf ihrer Erkrankung chirurgisch therapiert. Zu den Indikationen gehören bei dieser Erkrankung neben einem therapierefraktären Verlauf auch Darmperforationen, starke intestinale Blutungen, das Auftreten eines toxischen Megakolons und mukosale Dysplasien wie das kolorektale Karzinom (Roses RE & Rombeau JL (2008)). Im Gegensatz zum M. Crohn kann die operative Therapie bei der C. ulcerosa kausal und mit kurativem Ansatz durchgeführt werden. Dabei ist heute die restaurative Proktokolektomie mit ileopouchanaler Anastomose (IPAA) ein häufig verwendetes Operationsverfahren. Beim M. Crohn und perianalem oder ilealem Befall ist diese Operationstechnik jedoch kontraindiziert, da gezeigt werden konnte, dass postoperativ ein hohes Risiko von Abszessen, Fisteln und anorektalen Rezidiven im Bereich des Pouches besteht (Bruch HP et al. (2003)). Auch die IPAA kann neben der traditionellen offenen Vorgehensweise laparoskopisch angelegt werden. Ähnlich wie beim M. Crohn lässt die aktuelle Studienlage noch keine abschließende Bewertung der beiden Operationstechniken zu (Roses RE & Rombeau JL (2008)).

1.3 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten in einer pädiatrischen Patientengruppe aus München neue Kandidatengene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen identifiziert werden, um auf diese Weise einen Beitrag zum weiteren Verständnis der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Kindesalter zu leisten.

Hierzu wurde zunächst ein spezieller Genexpressionsarray entworfen, mit dem es möglich war, die Genexpression von verschiedenen proinflammatorischen Genen mittels real-time PCR bei Patienten mit CED und Kontrollen zu untersuchen. Nach Identifizierung des Kandidatengens Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (**CXCL9**) wurde der SNP rs2276886 in diesem Gen untersucht.

Weiterhin wurde die Expression des bereits bei erwachsenen Patienten beschriebenen Kandidatengens Nuclear receptor subfamily 1 group I member 2 (**NR1I2**) in der eigenen Untersuchungsgruppe analysiert und der SNP rs3814055 in diesem Gen untersucht.

2 Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Good clinical practice (Ethikvotum)

Die vorliegende Studie wurde durch die Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München am 7. Juni 2005 genehmigt (Projekt Nr. 104 – 05). Sämtliche Studienteilnehmer mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie auch die Patienten der Kontrollgruppe wurden vor der Probenentnahme über die Inhalte und Ziele der Studie aufgeklärt und hatten ihr Einverständnis gegeben. Bis zu einem Alter der Patienten von ca. 12 Jahren wurde auch die Zustimmung der Eltern eingeholt.

2.2 Studienteilnehmer

In die vorliegende Studie zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden 122 Patienten kaukasischer Abstammung eingeschlossen, bei denen die Erkrankungen M. Crohn, C. ulcerosa und C. indeterminata diagnostiziert worden war. Die Diagnosen wurden gemäß internationalem Konsensus der "Porto Kriterien" (Abschn. 1.2.3) durch Anamnese, klinische Untersuchung, radiologische und endoskopische Verfahren sowie histologische Abklärung gesichert (IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (2005)). Die Krankheitsausprägung und die Lokalisation im Gastrointestinaltrakt wurde entsprechend der "Montreal Classification" (Abschn. 1.2.3) erhoben (Silverberg MS et al. (2005); Satsangi J et al. (2006)). Patienten, die an klinisch relevanten Erkrankungen der Leber, der Nieren oder des Herzens litten, wurden von der Studie ausgeschlossen. An der Genexpressionsanalyse nahmen 10 Patienten und an der SNP-Analyse 114 Patienten teil. Zwei Patienten nahmen an beiden Analysen teil.

Im abdominalchirurgischen Zentrum des Städtischen Klinikums Bogenhausen in München wurden 120 Patienten ohne CED rekrutiert und nach ihrem Einverständnis in die Kontrollgruppe der SNP-Analyse aufgenommen. Es wurden bewusst ältere Patienten ausgewählt, da bei einer kindlichen Kontrollgruppe das Auftreten

von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Erwachsenenalter nicht hätte ausgeschlossen werden können.

2.3 Probengewinnung

Die Blutproben (9 ml EDTA Blut) wurden im Rahmen routinemäßiger Blutentnahmen von 32 CED-Patienten und 120 gesunden erwachsenen Kontrollpersonen gewonnen und unmittelbar bei -20°C tiefgefroren oder direkt verarbeitet (Abschn. 2.7.1). Weiterhin wurden von Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Kabesch (Dr. von Haunersches Kinderspital) weitere 82 DNA-Proben von CED-Patienten zur Verfügung gestellt. Diese Proben waren bereits zu einem früheren Zeitpunkt im Rahmen der "Multicentre Asthma Genetics in Childhood Study" (MAGICS) zu Risikogenen bei Kindern mit Asthma bronchiale als Kontrollgruppe gewonnen worden. Für die zusätzliche Untersuchung auf CED-spezifische Marker wurde bei der zuständigen Ethikkommission ein Votum eingeholt.

Dickdarmbiopsien wurden bei allen Patienten nur im Rahmen unterer Endoskopien oder Darmresektionen durchgeführt, bei denen aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen eine zwingende medizinische Indikation für den Eingriff vorlag. Als Kontrollgewebe für die Genexpressionsanalyse wurden Darmgewebeproben von Kindern mit nicht entzündlichen Darmerkrankungen (z. B. M. Hirschsprung, Primitiv neuroektodermaler Tumor (PNET), Volvulus) im Rahmen medizinisch indizierter Operationen gewonnen. Alle Darmgewebeproben wurden unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -196°C gelagert.

2.4 Laborgeräte und Materialien

Biofuge fresco	Kendro Laboratory Products, Osterode
Biofuge Pico	Kendro Laboratory Products, Osterode
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5702	Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Mastercycler personal	Eppendorf, Hamburg
Geldokumentationssystem GelJet Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Gelelektrophoresekammer Mini Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Homogenisator MICCRA D-8	ART Prozess- & Labortechnik, Müllheim
Labor-pH-Meter inoLab pH 720	WTW, Weilheim
Laborwaage ACCULAB VICON	ACCULAB Sartorius Group, Göttingen
Laborwaage TE 124S	Sartorius, Göttingen
Magnetheizrührer MR 3001	Heidolph Instruments, Schwabach
Microplate Zentrifuge	Kisker, Steinfurt
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Pipetten Research 10 µl, 100 µl, 1.000 µl, Mehrkanalpipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet pro	BRAND, Wertheim
Realplex ² Mastercycler Eppgradient S	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Spannungsquelle PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UNIMAX 1010 Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach
Universalwärmeschrank UNB-400	Memmert, Schwabach
VassarStats: Website for Statistical Computation (Stand: 01.10.2008)	http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

2.5 Chemikalien

10 x PCR Buffer (containing 15 mM MgCl ₂)	QIAGEN, Hilden
10 x Reaction Buffer for Mango Taq Polymerase	Bioline, Luckenwalde

Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Bioline Mango-Taq DNA Polymerase (1 U/ μ l)	Bioline, Luckenwalde
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
Desoxynucleoside Triphosphate Set PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 % p. a.	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol 100 % p. a.	Merck, Darmstadt
Ethidium bromide solution (10 mg/ml)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
FERMENTAS 6 x Ladepuffer	FERMENTAS, St. Leon-Rot
FERMENTAS GeneRuler 100 bp DNA Ladder (0,5 μ g/ μ l)	FERMENTAS, St. Leon-Rot
GIBCO Invitrogen ultraPURE (distilled Water, DNase, RNase Free)	Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen Super Script™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Isoamylalkohol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol 100 %	Carl Roth, Karlsruhe
iTaq SYBR Green Supermix with ROX	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (50 mM)	Bioline, Luckenwalde
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
PeqGOLD Universal Agarose	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Proteinase K	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
QIAGEN Hot Star Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	QIAGEN, Hilden
QIAGEN RNase-Free DNase Set (50)	QIAGEN, Hilden
QIAGEN RNeasy MiniKit (50)	QIAGEN, Hilden

Random Hexamere	Roche Diagnostics, Mannheim
Roche RNase H (1 U/ μ l)	Roche Diagnostics, Mannheim
Salzsäure 37 % p. a.	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay ID: rs3814055	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan SNP Genotyping Assay ID: rs2276886	Applied Biosystems, Foster City, USA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TRI Reagent	MRC, Cincinnati, USA
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-Puffer (pH 7,0)	Apotheke Klinikum Innenstadt, Ludwig-Maximilians-Universität München

2.6 Genexpressionsanalyse

2.6.1 Isolierung von total RNA aus Gewebe

Zur Homogenisierung des Dickdarmgewebes wurden pro Gewebeprobe 2 ml Tri-Reagent in 14 ml Tubes vorgelegt. Anschließend wurden die Darmgewebeproben mit einem sterilen Einwegskalpell in einer mit Eis gekühlten Petrischale manuell zerkleinert und in ein vorbereitetes 14 ml Tube gegeben. Im nächsten Schritt wurden die einzelnen Darmgewebeproben mit einem Homogenisator zerkleinert. Vor jedem Gebrauch und nach jedem Homogenisierungsvorgang wurde der Homogenisator zunächst in bidestilliertem Wasser und danach in Tri-Reagent gewaschen.

Die Lysate wurden auf je zwei 2 ml Tubes aufgeteilt und 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von 0,4 ml Chloroform wurden die Proben für 15 Sekunden auf dem Schüttelgerät (Vortex) gemischt und dann erneut 3 Minuten bei RT inkubiert. In einer Zentrifugation (15 min, 12.000 x g, 4°C) erfolgte anschließend eine Phasentrennung.

Für die weitere Verarbeitung wurde die obere Phase in ein neues 2 ml Tube überführt und die RNA durch Zugabe von 1 Vol. 100 % Isopropanol gefällt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei RT wurde erneut zentrifugiert (15 min, 12.000 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Danach wurden 1,5 ml gekühlter Ethanol (70 %) hinzugefügt und die Probe kurz mit dem Vortex geschüttelt.

Es folgte eine weitere fünfminütige Zentrifugation bei 7.500 x g und 4°C. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet luftgetrocknet. Anschließend wurde dasselbe in 25 µl bidestilliertem Wasser für 15 Minuten bei 55°C gelöst und die zu Beginn auf zwei Tubes aufgeteilten RNA-Proben eines Patienten wieder zusammengeführt, sodass ein Gesamtvolumen der Lösung von 50 µl entstand. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der gelösten RNA mit 98 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und bei 260 nm photometrisch gemessen. Die extrahierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.6.2 Aufreinigung der RNA (DNase I-Verdau)

Der DNase-Verdau wurde mit dem RNeasy MiniKit der Firma QIAGEN durchgeführt. Zwischen den Arbeitsschritten wurden die RNA-Proben auf Eis gelagert, sofern das Protokoll keine Inkubation bei RT vorsah. Entsprechend den Herstellerangaben wurde der RPE-Puffer aus dem QIAGEN RNeasy MiniKit mit 4 Vol. 100 % Ethanol versetzt. Dann wurden 1500 Kunitz Units DNase I (QIAGEN RNase-Free DNase Set) in 550 µl bidestilliertem Wasser gelöst und davon 10 µl Aliquots hergestellt. Pro benötigtem 1 ml RLT-Puffer (QIAGEN RNeasy MiniKit) wurden unter dem Abzug 10 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt.

Zunächst wurden 100 µg total RNA mit bidestilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Dann wurden unter dem Abzug zunächst 350 µl RLT-Puffer (QIAGEN RNeasy MiniKit) hinzugegeben, der Ansatz gemischt und mit 250 µl Ethanol (100 %) versetzt. Nach erneutem Mischen wurde pro Probe eine Säule (QIAGEN RNeasy MiniKit) auf ein spezielles 2 ml Collectiontube (QIAGEN RNeasy MiniKit) gesetzt und der Ansatz unter dem Abzug auf die Säule pipettiert.

Nach einer kurzen Zentrifugation (15 sec, 8.000 x g) bei RT wurde die Säule auf ein neues 2 ml Collectiontube gesetzt und 350 µl RW1-Puffer aus dem QIAGEN

RNeasy MiniKit hinzugegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation (15 sec, 8.000 x g, RT).

Als nächstes wurden für jede RNA-Probe 10 µl DNase I mit 70 µl RDD-Puffer aus dem QIAGEN RNase-Free DNase Set vorsichtig gemischt und direkt auf die Silicagelmembran der Säule pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wurden 350 µl RW1-Puffer (QIAGEN RNeasy MiniKit) hinzugegeben und die Säule für 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl RPE-Puffer aus dem QIAGEN RNeasy MiniKit auf die Silicagelmembran pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 sec, 8.000 x g, RT) wurde der Durchfluss wieder verworfen und erneut 500 µl RPE-Puffer (QIAGEN RNeasy MiniKit) hinzugefügt.

Anschließend wurde der Ansatz 2 Minuten bei 8.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach folgte eine einminütige Zentrifugation bei 12.000 x g. Nun wurde die Säule auf ein 1,5 ml Collectiontube (QIAGEN RNeasy MiniKit) gesetzt und 30 µl bidestilliertes Wasser direkt auf die Silicagelmembran gegeben. Nach einer Minute Inkubationszeit zur Lösung der RNA wurde der Ansatz zentrifugiert (1 min, 8.000 x g, RT). Es wurden wiederum 30 µl bidestilliertes Wasser auf die Silicagelmembran pipettiert, und nach einer weiteren Minute folgte eine abschließende Zentrifugation (1 min, 8.000 x g, RT). Im 1,5 ml Collectiontube befanden sich nun pro Gewebeprobe 60 µl gelöste RNA, die bei -80°C eingefroren wurde. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl der gelösten RNA mit 98 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und bei 260 nm photometrisch gemessen.

2.6.3 cDNA-Synthese

Für die Genexpressionsmessungen wurde die zuvor isolierte und DNase verdaute RNA wie folgt in cDNA umgeschrieben: Für den Genexpressionsarray (Abschn. 2.6.4) wurden jeweils 5 µg RNA in einem Ansatzvolumen von 41 µl transkribiert. Dazu wurden 5 µg aufgereinigte RNA mit bidestilliertem Wasser auf ein Volumen von 14 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 10 µl Random Hexamere (20 ng/µl) folgte eine Inkubation des Ansatzes für 10 Minuten bei 70°C . Im folgenden Schritt

wurden jeder Probe 8 µl First Strand Puffer, 4 µl DTT-Puffer (0,1 M) aus dem Reaktionskit Invitrogen Super Script™ II Reverse Transcriptase und 2 µl dNTPs (10 mM) zugesetzt.

Nach einer zehnminütigen Inkubation bei 25°C und einer direkt darauffolgenden zweiminütigen Inkubation bei 42°C wurden dem Ansatz 2 µl Superscript II aus dem Reaktionskit Invitrogen Super Script™ II Reverse Transcriptase hinzugefügt und durch vorsichtiges Kreisen der Pipettenspitze gemischt. Nun folgte eine einstündige Inkubation bei 42°C, der sich eine Inkubation für 10 Minuten bei 70°C anschloss. Nach Zugabe von 1 µl RNase H (1 U/µl) und vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz nochmals für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug somit 41 µl und wurde für den Genexpressionsarray mit 69 µl bidestilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt.

Für die Expressionsanalyse einzelner Kandidatengene wurden lediglich 2 µg RNA in einem kleineren Ansatzvolumen von 21 µl umgeschrieben, das anschließend ebenfalls mit bidestilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt wurde. Mit Ausnahme der 1 µl RNase H (1 U/µl) wurden die Mengen aller anderen Reagenzien halbiert. Die Arbeitsschritte und Inkubationszeiten wurden nicht verändert. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.6.4 Genexpressionsarray

Ein Genexpressionsarray eignet sich dafür, die Expression einer großen Anzahl von Genen in einem Experiment parallel zu ermitteln. Er basiert auf dem Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR). Das Prinzip der PCR besteht in einer exponentiellen Vervielfältigung (Amplifikation) spezifischer DNA-Abschnitte (Saiki RK (1985)). Hierzu werden initial bei hoher Temperatur beide DNA-Stränge voneinander getrennt (Denaturierung). Nach einer Temperaturreduktion binden spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, an ihre korrespondierende Basensequenz am jeweiligen DNA-Strang (Annealing). Ausgehend von den Primern ist eine hitzebeständige Polymerase in der Lage, die komplementäre Basenabfolge zum jeweiligen DNA-Strang zu synthetisieren (Elongation). Im Rahmen eines weiteren Erhitzungsschrittes trennen sich die synthetisierten Doppel-

stränge wieder, und die Primer können erneut binden. Durch eine häufige Wiederholung dieses Zyklusses wird eine hohe Amplifikationsrate des entsprechenden DNA-Abschnitts erreicht. Die sogenannte *realtime*-PCR ermöglicht darüber hinaus eine Quantifizierung der Amplifikate nach jedem PCR-Zyklus in Echtzeit durch Verwendung von in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen (indirekter Nachweis) oder TaqMqan-Probes (direkter Nachweis).

In dieser Arbeit wurde für die *realtime*-PCR der fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff hat die Eigenschaft, in doppelsträngige DNA zu interkalieren. Je mehr Kopien eines DNA-Abschnittes im Verlauf einer PCR amplifiziert werden, desto mehr Farbstoff interkaliert in die synthetisierten Doppelstränge, und desto größer ist die vom PCR-Thermocycler gemessene Fluoreszenz. Da die gemessene Fluoreszenz proportional zur Anzahl der Amplifikate ist, kann hieraus die Genexpression bestimmt werden.

Mittels eines im Kinderchirurgischen Forschungslabor entwickelten Genexpressionsarrays ließ sich im Rahmen einer *realtime*-PCR die Expression von 88 Genen in einem Gewebe bestimmen. Um neue Kandidatengene zu ermitteln, sollte diese große Anzahl von Genen zunächst im Kolongewebe von fünf Kindern, davon drei Patienten mit M. Crohn und zwei Kontrollen, untersucht werden.

Der Genexpressionsarray bestand aus 88 genspezifischen Primerpaaren, die in die Kammern A1 – H4 einer 96-well-Platte vorgelegt wurden. Hierzu wurden jeweils 1 µl des Forward Primers (10 µM) und 1 µl des Reverse Primers (10 µM) pipettiert. Die Kammern H5 – H10 wurden mit Primern des Housekeeping-Gens TATA-Box-binding-protein (*TBP*) versehen. In den Kammern H11 und H12 wurde mit bidestilliertem Wasser eine Negativkontrolle (*NTC*) durchgeführt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GLI1	GLI2	GLI3	PTCH1	PTCH2	SHH	BCL2	NMYC	OPN	IGF2	FOXA2	FOXF1
B	FZD1	FZD2	TCF7	LEF1	WIF1	WISP1	DKK1	PLAG1	TWIST	SNAIL	SLUG	WNT5A
C	TGFB1	TGFB2	TGFB3	TGFBR1	TGFBR2	TGFBR3	TGIF	BMP2	BMP4	SMURF1	SMAD3	SMAD5
D	JAK1	JAK2	JAK3	STAT1	STAT2	CXCL9	IL4	IL4R	JUNB	GATA3	IFNG	IRF1
E	TP53	TP53I3	MDM2	IGFBP3	GADD45A	BAX	AKT1	AKT3	IRS1	IRS2	BAD	BID
F	NFKB1	NFKB2	IL1A	IL2	IL10	BIRC2	BIRC5	LTA	NOS2A	TNF	CARD4	IFNA1
G	CCNB1	CCND1	CCND2	CDK2	CDK4	CDKN1A	CDKN1B	CDKN1C	CDKN2A	CDKN2B	RB1	NR1I2
H	FAS	FASLG	TLR2	TLR4	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	TBP	NTC	NTC

Abb. 2.1 Gene des Genexpressionsarrays auf einer 96-well-Reaktionsplatte

Für den Genexpressionsarray wurden je 5 µg total RNA aus dem Kolon der drei Kinder mit M. Crohn und der zwei Kontrollen in cDNA umgeschrieben (Abschn. 2.6.1 – 2.6.3) und ein **Reaktionsmix A** hergestellt (Tab. 2.1).

Tab. 2.1 Reaktionsmix A für eine 96-well-Reaktionsplatte

Aqua bidestilliert	1.127,0 µl
SYBR-Green	1.225,0 µl
cDNA	98,0 µl
Gesamtvolumen	2.450,0 µl

Von dem **Reaktionsmix A** wurden jeweils 23 µl in die Kammern A1 – H5 pipetiert, sodass der endgültige Reaktionsansatz zusammen mit 2 µl Primern pro Kammer 25 µl betrug. In den Kammern H5 – H10 wurde eine Verdünnungsreihe angelegt, bei der die cDNA, ausgehend von einer relativen Konzentration von 100 % in H5, in den Kammern H6 – H10 kontinuierlich um 1:10 verdünnt wurde.

Für diese Verdünnungsreihe wurde ein **Reaktionsmix B** aus 100 µl SYBR-Green und 100 µl bidestilliertem Wasser hergestellt. Von dem **Reaktionsmix B** wurden in der Kammer H6 27 µl mit 3 µl des **Reaktionsmix A** vermischt. Dieser Kammer wurden anschließend 3 µl entnommen und in der Kammer H7 erneut mit 27 µl des **Reaktionsmix B** vermischt. Aus dem Ansatz in Kammer H7 wurden wieder 3 µl in

Kammer H8 überführt und mit 27 µl **Reaktionsmix B** verdünnt. Diese Schritte wurden nochmals für den Ansatz in den Kammern H8, H9 und H10 wiederholt.

Die Kammer H11 wurde mit 1 µl total RNA (aus der die cDNA transkribiert worden war) und 24 µl einer 1:1 Verdünnung aus SYBR-Green und bidestilliertem Wasser versehen. Die Kammer H12 wurde mit 1 µl H₂O und ebenfalls 24 µl einer 1:1 Verdünnung aus SYBR-Green und bidestilliertem Wasser als Negativkontrolle gefüllt. Anschließend wurde die 96-well-Platte für 1 Minute bei 200 x g zentrifugiert und die *realtime*-PCR gemäß des PCR-Programms in Tab. 2.2 durchgeführt.

Tab. 2.2 PCR-Programm des Genexpressionsarrays

Arbeitsschritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	2 min	95°C
Denaturierung	40	15 sec	95°C
Annealing		15 sec	55°C
Elongation		20 sec	68°C
Finale Elongation	1	15 sec	95°C

Bei verschiedenen Kandidatengen (***CXCL9***, ***NOS2A***, ***NR1I2***) wurde die Expressionsmessung auf zehn Kolongewebeproben von fünf Kindern mit M. Crohn, drei Kindern mit C. ulcerosa und zwei Kindern ohne CED erweitert. Die Primersequenzen der untersuchten Gene sowie des Houskeeping-Gens ***TBP*** sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

Die cDNA-Synthese wurde gemäß den in Abschnitt 2.6.3 beschriebenen Versuchsschritten mit 2 µg aufgereinigter RNA durchgeführt. Bei allen Versuchsansätzen (Tab. 2.4) der Genexpressionsanalyse wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, die anstelle der cDNA bidestilliertes Wasser enthielt. Die Expressionsmessungen erfolgten pro Gewebeprobe zweifach, in sogenannten Dubletten, gemäß des PCR-Programms in Tab. 2.2.

Tab. 2.3 Primersequenzen der Kandidatengene

Gen	Primersequenz
<i>CXCL9</i>	forward: 5' – CCCAGATTCAGCAGATGTGAAG – 3' reverse: 5' – TTGATGTTTTTTCCCATTCTTTTG – 3'
<i>NOS2A</i>	forward: 5' – CTGCTCCAAAAGCTGGCC – 3' reverse: 5' – TCCAATTGCTGTACTCTGAGGG – 3'
<i>NR1I2</i>	forward: 5' – TCAATGCGGAGACTGGAACC – 3' reverse: 5' – GGCTCCAGTAGAAGTTGCTGGA – 3'
<i>TBP</i>	forward: 5' – GCCCGAAAGGCCGAATAT – 3' reverse: 5' – CCGTGGTTCGTGGCTCTCT – 3'

Tab. 2.4 PCR-Ansatz der Genexpressionsanalyse

Forward Primer (10 µM)	1,0 µl
Reverse Primer (10 µM)	1,0 µl
Aqua bidestilliert	10,0 µl
SYBR-Green	12,0 µl
cDNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

2.6.5 Quantifizierung der Genexpression

Die Quantifizierung der Genexpression wurde mittels der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode durchgeführt (Pfaffl MW (2001)). Hierzu wurde zunächst für jede Amplifikation der sogenannte ct-Wert (cycle threshold) bestimmt. Der ct-Wert gibt an, bei welchem PCR-Zyklus die Fluoreszenz einen definierten Grenzwert (threshold) überschreitet.

Um die ct-Werte eines Gens in den zehn verschiedenen Darmgewebeproben vergleichbar zu machen, wurde in jedem Gewebe über die Expression des House-keeping-Gens *TBP* normalisiert. Dabei handelt es sich um ein Gen, das unabhängig von äußeren Einflüssen in allen Körperzellen konstant exprimiert wird.

Die Expressionsunterschiede wurden als ein Vielfaches ausgedrückt und aus den Mittelwerten von Patienten und Kontrollen über folgende Formel berechnet:

$$\text{Expressionsunterschied} = 2^{-(Ct_{\text{Kandidatengen}} - Ct_{\text{TBP}})_{\text{Patient}} - (Ct_{\text{Kandidatengen}} - Ct_{\text{TBP}})_{\text{Kontrolle}}}$$

Ein Gen wurde als überexprimiert gewertet, wenn der Expressionsunterschied (fold change) ≥ 3 betrug. Dies entspricht einer mindestens dreifach überhöhten Expression der als 1 festgesetzten basalen Expression.

2.7 Genotypenanalyse

2.7.1 DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Für die Isolierung genomischer DNA wurden im Rahmen routinemäßiger Blutentnahmen von jedem Patienten und von den Kontrollpersonen 9 ml EDTA-Blut gewonnen (Abschn. 2.3). Vor der DNA-Präparation wurden die bei -20°C gelagerten Blutproben 5 – 10 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in ein steriles 50 ml Tube gefüllt. Anschließend wurden 30 ml Erythrozyten-Lysepuffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0,1 mM EDTA, pH 7,4) hinzugegeben und der Ansatz nach mehrmaligem vorsichtigen Mischen für 30 Minuten auf Eis inkubiert und während dieser Zeit mindestens viermal durch langsames Schwenken durchmischt. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet erneut in 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 1.000 x g, 4°C) wurde der Überstand erneut abgeschüttet und das Zellpellet in 5 ml SE-Puffer (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert.

Hiernach wurden die Proben erneut zentrifugiert (10 min, 1.000 x g, 4°C) und der Überstand verworfen. Im Folgenden wurde das Zellpellet nochmals in 5 ml SE-Puffer resuspendiert und der Ansatz mit 40 μl Proteinase K (10 mg/ml) und 250 μl SDS (0,2 M) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Sekunden auf dem Vortex gemischt und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Dem Ansatz wurden nun 5 ml Phenol zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde das Gemisch für 15 Minuten auf den Schüttler gelegt. Durch eine anschließende

Zentrifugation (10 min, 1.500 x g, 10°C) bildeten sich im Reaktionsgefäß drei Phasen aus. In der obersten hydrophilen Phase befanden sich die gelösten Nukleinsäuren, in der mittleren Phase sammelten sich die denaturierten Proteine und in der unteren hydrophoben Phase das Phenol. Mit einer Pipette wurde die obere Phase vorsichtig aspiriert, in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einem 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch durch starkes Schütteln vermischt und für 10 Minuten auf den Schüttler gelegt.

Durch eine weitere Zentrifugation (10 min, 1.500 x g, 10°C) bildeten sich erneut zwei Phasen aus, von denen die obere Phase wieder die gelösten Nukleinsäuren enthielt.

Nach vorsichtiger Trennung der Phasen und Überführung der oberen Phase in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß wurde dieses mit 1 Vol. 100 % Isopropanol aufgefüllt. Anschließend wurden 0,005 Vol. einer Natriumacetat-Lösung (3 M, mit Essigsäure auf pH 5,2 eingestellt) zugesetzt und die DNA durch langsames Schwenken des Reaktionstubes gefällt. Für den folgenden Waschvorgang wurde für jede DNA-Probe ein 1,5 ml Tube mit je 1.000 µl eiskaltem Ethanol (70 %) vorbereitet und der ausgefallene DNA-Faden vorsichtig mit einer Pipette überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 12.000 x g wurde das Ethanol dekantiert und das Pellet im Tube für ca. 10 Minuten getrocknet. Je nach Größe wurden die Pellets in 100 – 500 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und für 15 Minuten bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 2 µl DNA-Lösung mit 98 µl TE-Puffer verdünnt und die DNA-Konzentration bei 260 nm im Photometer gemessen.

Die isolierten DNA-Proben dienten als Stammlösungen und wurden bei –20°C gelagert. Für die weiteren Experimente wurden Arbeitslösungen von 50 ng/µl und 5 ng/µl hergestellt, sodass die DNA in den Stammlösungen nicht durch das wiederholte Auftauen und Einfrieren fragmentiert wurde.

2.7.2 Qualitätskontrolle der isolierten DNA

Um die Qualität der isolierten DNA zu überprüfen, wurde in einem ersten Arbeitsschritt eine PCR mit drei Primerpaaren und jeweils fünf DNA-Proben durchgeführt.

Den Reaktionsansatz zeigt Tab. 2.5. Die PCR wurde nach dem Programm in Tab. 2.6 durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Tab. 2.5 PCR-Ansatz zur DNA-Qualitätskontrolle (1. Arbeitsschritt)

Forward Primer (10 µM)	1,0 µl
Reverse Primer (10 µM)	1,0 µl
Aqua bidestilliert	14,4 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
QIAGEN HotStarTaq® DNA Polymerase (5 U/µl), inkl. MgCl ₂	0,2 µl
10 x PCR-Puffer	2,0 µl
DNA (50 ng/µl)	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Tab. 2.6 PCR-Programm zur DNA-Qualitätskontrolle

Arbeitsschritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	7 min	95°C
Denaturierung	35	30 sec	95°C
Annealing		1 min	55°C
Elongation		2 min	72°C
Finale Elongation	1	5 min	72°C

Für die Gelelektrophorese wurden Agarosegele in einprozentiger Konzentration in 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) hergestellt. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Laufspannung von 90 V über einen Zeitraum von ca. 40 Minuten durchgeführt. Als Längenstandard wurde ein 100 bp DNA-Marker verwendet. Die DNA-Fragmente wurden mit dem Geldokumentationssystem der Firma Intas Science Imaging Instruments visualisiert und digitalisiert.

Die Primersequenzen der in der PCR verwendeten Gene Interferon- γ (**IFNG**), Insulin-like growth factor 2 (**IGF2**) und Signal transducer and activator of transcription 2 (**STAT2**) sind in Tab. 2.8 aufgeführt. Mit dem Primerpaar, das die deutlichsten Ergebnisse lieferte (Abschn. 3.2), wurden in einem zweiten Arbeitsschritt alle 152 isolierten DNA-Proben auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft (PCR-Programm siehe Tab. 2.6). In diesem Versuchsteil musste dem Reaktionsprodukt in der Gelelektrophorese kein Ladepuffer hinzugefügt werden, da dieser im PCR-Ansatz bereits enthalten war (Tab. 2.7).

Tab. 2.7 PCR-Ansatz zur DNA-Qualitätskontrolle (2. Arbeitsschritt)

Forward Primer (10 μ l)	1,0 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	1,0 μ l
Aqua bidestilliert	13,1 μ l
dNTPs (10 mM)	0,4 μ l
Mango Tag DNA Polymerase (1 U/ μ l)	0,5 μ l
MgCl ₂	1,0 μ l
10 x PCR-Puffer	2,0 μ l
DNA (50 ng/ μ l)	1,0 μ l
Gesamtvolumen	20,0 μl

Tab. 2.8 Primersequenzen zur DNA-Qualitätskontrolle

Gen	Primersequenz
<i>IFNG</i>	forward: 5' – GTAGCGGATAATGGAACTCTTTTCTT – 3' reverse: 5' – AGGAGACAATTTGGCTCTGCAT – 3'
<i>IGF2</i>	forward: 5' – CCTCCGACCGTGCTTCC – 3' reverse: 5' – GGTGGACTGCTTCCAGGTGT – 3'
<i>STAT2</i>	forward: 5' – TTACCTGCTCCTGGGTGGAG – 3' reverse: 5' – GGGAGTGACTGCAGCACCTC – 3'

2.7.3 Bestimmung des optimalen Reaktionsvolumens

Um ein optimales Reaktionsvolumen für die *realtime*-PCR zu ermitteln, wurde eine Test-PCR durchgeführt, die das Reaktionsprodukt verschiedener Reaktionsvolumina im Vergleich zeigen sollte. Hierfür wurden zwei DNA-Proben mit jeweils vier unterschiedlichen Reaktionsvolumina getestet.

Zunächst wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, das auf einem durchschnittlichen Reaktionsvolumen von 18 μl basierte (Tab. 2.9). Von diesem Reaktionsmix wurden jeweils 10 μl , 15 μl , 20 μl und 25 μl auf eine Reaktionsplatte pipettiert und eine *realtime*-PCR mit dem Primerpaar des Gens *IFNG* (Tab. 2.8) nach dem PCR-Programm in Tab. 2.10 durchgeführt.

Tab. 2.9 Reaktionsmix zur Bestimmung des optimalen Reaktionsvolumens

Forward Primer (10 μM)	4,0 μl
Reverse Primer (10 μl)	4,0 μl
Aqua bidestilliert	24,0 μl
SYBR-Green	36,0 μl
DNA (50 ng/ μl)	4,0 μl
Gesamtvolumen	72,0 μl

Tab. 2.10 PCR-Programm zur Volumenbestimmung

Arbeitsschritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	2 min	95°C
Denaturierung	40	15 sec	95°C
Annealing		15 sec	55°C
Elongation		20 sec	68°C
Finale Elongation	1	15 sec	95°C

2.7.4 Genotypisierung mittels TaqMan-Sonden

Ein TaqMan Genotyping Assay zur Genotypisierung basiert auf der *realtime*-PCR-Technologie (2.6.4). Spezifische Primer binden dabei vor und hinter dem Abschnitt der DNA, in welchem der Polymorphismus liegt. Zwei weitere Oligonukleotide, die sogenannten TaqMan-Sonden, binden direkt am Ort des Polymorphismus. Eine TaqMan-Sonde ist komplementär zu der Basenabfolge des häufigeren Allels (Allel A), die andere TaqMan-Sonde bindet an die Basensequenz des selteneren Allels (Allel B). Beide TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff (reporter dye) markiert.

Am 3'-Ende ist jede TaqMan-Sonde mit einem Quencher (aus dem englischen "to quench" = abfangen) bestückt, der die Emission des "reporter dye" unterdrückt, solange er in enger räumlicher Nähe zu diesem steht. Bindet eine TaqMan-Sonde während der PCR an das für sie spezifische Allel, kommt es im weiteren Verlauf dazu, dass die Polymerase, die einen Doppelstrang im Bereich des Polymorphismus synthetisiert, an das 5'-Ende der TaqMan-Sonde stößt. Die Polymerase baut auf ihrem Weg vom 5'-Ende zum 3'-Ende den "reporter dye" am 5'-Ende der TaqMan-Sonde ab, sodass dieser abdiffundiert und die Entfernung zum Quencher zunimmt (Cleavage). Dadurch ist die Lichtemission des "reporter dye" nicht mehr unterdrückt und kann vom PCR-Cycler als Fluoreszenzsignal gemessen werden. Je nachdem, welche Allele vorliegen bzw. welche TaqMan-Sonde entsprechend binden kann, wird auch das spezifische Signal detektiert und somit der Genotyp eines Patienten bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Polymorphismen im Patientenkollektiv und in der Kontrollgruppe untersucht. Der eine SNP liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (4q21) im Intron 1 des Gens *CXCL9* (SNP-ID: rs2276886), der andere im kodierenden DNA-Abschnitt für den Nuclear pregnane X receptor (PXR) (SNP-ID: rs3814055) auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3q13) (OMIM (2008)).

Im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit waren die für das Allel A spezifischen TaqMan-Sonden mit dem Farbstoff VIC markiert, dessen Fluoreszenz bei 550 nm gemessen wurde. Die TaqMan-Sonde für das Allel B enthielten den Fluoreszenzfarbstoff FAM mit einer Lichtemission bei der Wellenlänge 520 nm.

Wie in Abschnitt 2.7.1 beschrieben, wurden die DNA-Proben in einer Konzentration von 5 ng/ μ l vorgehalten und auf Musterplatten vorgelegt, von denen sich mit Hilfe einer Mehrkanalpipette zügig die Reaktionsplatten herstellen ließen. Die insgesamt 234 DNA-Proben (114 Patienten und 120 Kontrollen) wurden in Dubletten auf insgesamt fünf 96-well-Reaktionsplatten verteilt, wobei zwei Negativkontrollen pro Reaktionsplatte zur Qualitätskontrolle vorhanden waren.

Hierzu wurde ein Reaktionsmix (Tab. 2.11) hergestellt, der unter Berücksichtigung eines möglichen Pipettierfehlers für 102 Reaktionen ausgelegt war. Von diesem Reaktionsmix wurden mit einem Dispenser (spezielle Pipettierhilfe) 12 μ l Reaktionsmix in jede Kammer der 96-well-Platte vorgelegt.

Im nächsten Schritt wurden mit einer Mehrkanalpipette je 3 μ l der DNA-Proben von den Musterplatten in die Reaktionsplatten überführt, sodass der Reaktionsansatz eine DNA-Konzentration von 15 ng enthält. Anschließend wurden die Platten 1 Minute bei 200 x g zentrifugiert und eine PCR nach dem Programm in Tab. 2.12 durchgeführt.

Tab. 2.11 Reaktionsmix für die Genotypisierungsreaktionen

TaqMan Universal Master Mix	750,0 μ l
20 x TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay	75,0 μ l
Aqua bidestilliert	400,0 μ l
Gesamtvolumen	1.225,0 μl

Tab. 2.12 PCR-Programm des SNP-Genotyping-Assay

Arbeitsschritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	10 min	95°C
Denaturierung	40	15 sec	92°C
Annealing/Extending		90 sec	60°C

2.7.5 Statistik

Die Auswertung der Genotypisierung beruhte auf der vergleichenden Analyse der ct-Werte. Grundsätzlich wurden die ct-Werte der mit FAM (Allel B) markierten TaqMan-Sonde von den ct-Werten der VIC (Allel A) markierten TaqMan-Sonde subtrahiert. Aufgrund der Messung in Dubletten wurde diese Rechnung für beide Reaktionsansätze einer DNA-Probe durchgeführt und aus den Ergebnissen ein Mittelwert gebildet. Für jeden Genotyp ergaben sich somit charakteristische Zahlenwerte. So lagen die Werte für den Genotyp AB zwischen $-x$ und $+x$, für den Genotyp AA unterhalb von x und für den Genotyp BB oberhalb von x . Neben den Genotypen wurde auch die Allelfrequenz als Untersuchungsparameter herangezogen.

Soweit nicht anders gekennzeichnet, wurden die p-Werte als zweiseitige (two-tailed) p-Werte nach dem exakten Test nach Fischer für Vier- und Sechsfeldertafeln berechnet. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant, ein p-Wert $< 0,01$ als statistisch hoch signifikant gewertet. Die Chancenverhältnisse (odds ratio (OR)) wurden mit einem 95 % Konfidenzintervall angegeben. Als Hilfsmittel für die mathematischen und statistischen Berechnungen wurde die im Internet frei verfügbare Statistiksoftware "VassarStats: Website for Statistical Computation" des Vassar College, Poughkeepsie, USA verwendet.

Für die statistische Auswertung wurden alle Patienten entsprechend ihrer Diagnose gruppiert und der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die Patientengruppe umfasste 78 Kinder mit M. Crohn, 32 Kinder mit C. ulcerosa und 4 Kinder mit C. indeterminata. Unter den Kindern mit M. Crohn wurden weiterhin variable Phänotypen der Erkrankung (Befall des oberen Gastrointestinaltrakts, Ileumbefall, Kolonbefall, Anusbefall, Fistelbildung, Stenose, Operation, extraintestinale Symptome und familiäre Häufung von M. Crohn) untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Mit dem Genexpressionsarray wurden 88 Gene im Kolongewebe von drei Kindern mit M. Crohn und zwei Kontrollen analysiert (Abschn. 2.6.4). Die grafische Auswertung in Abb. 3.1 zeigt mittels eines Farbcodes die Stärke der Genexpression in den fünf Kolonproben der Patienten und Kontrollen. Alle Werte wurden über die Expression des House-keeping-Gens *TBP* normalisiert (Abschn. 2.6.5). Einige der in der vorliegenden Untersuchung überexprimierten Gene waren bereits Gegenstand von Studien mit CED (Abschn. 4.1). Andere Gene wurden bisher jedoch noch nicht im Zusammenhang mit *C. ulcerosa* oder M. Crohn untersucht.

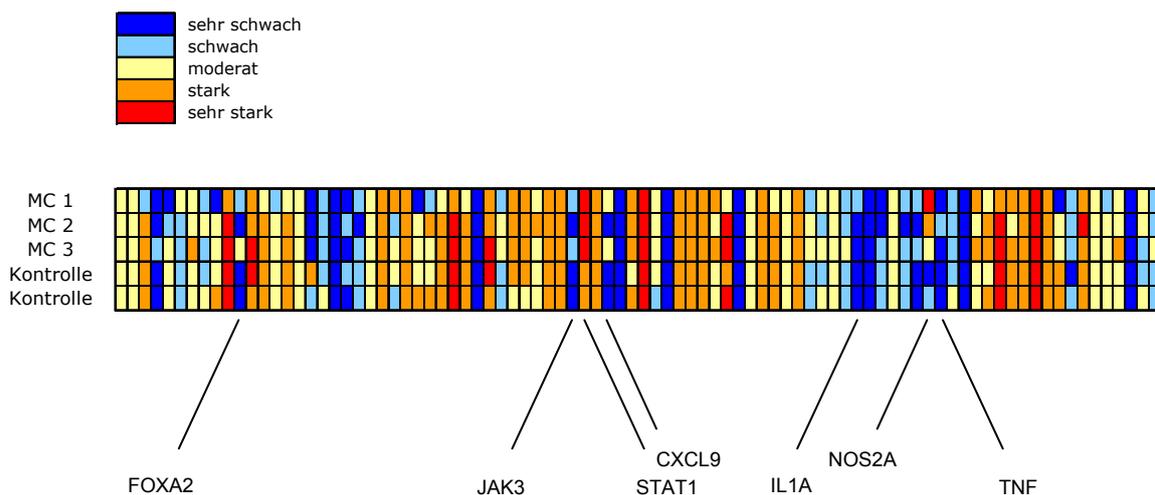


Abb. 3.1 Auswertung des Genexpressionsarrays mit 88 Genen bei Kindern mit M. Crohn und Kontrollpersonen

Die sieben Gene Signal transducer and activator of transcription 1 (**STAT1**), Janus kinase 3 (**JAK3**), Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (**TNF**), Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (**CXCL9**), Forkhead box A2 (**FOXA2**), Interleukin-1 α (**IL1A**) und Nitric oxide synthase 2A (**NOS2A**) waren bei den Patienten mit einem fold change ≥ 3 gegenüber den Kontrollen überexprimiert (Tab. 3.1).

Da **CXCL9** im Rahmen chemokinvermittelter Entzündungsreaktionen als Ligand der proinflammatorischen CXCR3-Achse fungiert, erschien eine Rolle dieses Gens bei CED möglich, und es wurde als Kandidatengen definiert.

Übereinstimmend mit bisherigen Expressionsstudien bei CED war im eigenen Genexpressionsarray das Gen **NOS2A** stark überexprimiert, weshalb dieses Gen als Positivkontrolle in alle weiteren Messungen einbezogen wurde (Gupta SK et al. (1998), Kolios G et al. (2004)).

Weiterhin sollte mit **NR1I2** ein Gen bei erkrankten Kindern untersucht werden, welches als potentiell Kandidatengen bei erwachsenen CED-Patienten beschrieben worden war (Dring MM et al. (2006)).

Tab. 3.1 Im Genexpressionsarray überexprimierte Gene

Gen	fold change
Signal transducer and activator of transcription 1 (<i>STAT1</i>)	3,20
Janus kinase 3 (<i>JAK3</i>)	3,22
Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (<i>TNF</i>)	3,41
Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 (<i>CXCL9</i>)	4,58
Forkhead box A2 (<i>FOXA2</i>)	4,69
Interleukin-1 α (<i>IL1A</i>)	5,62
Nitric oxide synthase 2A (<i>NOS2A</i>)	56,89

Es folgte eine Expressionsmessung des Kandidatengens **CXCL9**, der Positivkontrolle **NOS2A** und des Gens **NR1I2** im Kolongewebe von insgesamt zehn Kindern, davon 5 mit M. Crohn (**MC1 – MC5**), 3 mit C. ulcerosa (**CU 1 – CU3**) und 2 Kontrollen (**Kontrolle 1 bzw. 2**). Das Gen **CXCL9** war bei drei von fünf Patienten mit M. Crohn und bei allen Kindern mit C. ulcerosa gegenüber der Kontrollgruppe stark überexprimiert (Abb. 3.2). Auch **NOS2A** war in allen Kolonproben der Patienten in Bezug auf Normalgewebe überexprimiert (Abb. 3.3). **NR1I2** war bei zwei Patienten mit M. Crohn gegenüber der Kontrollgruppe überexprimiert. Im Kolongewebe der Kinder mit C. ulcerosa war die Expression von **NR1I2** geringer bzw. gleich wie im Kontrollgewebe (Abb. 3.4).

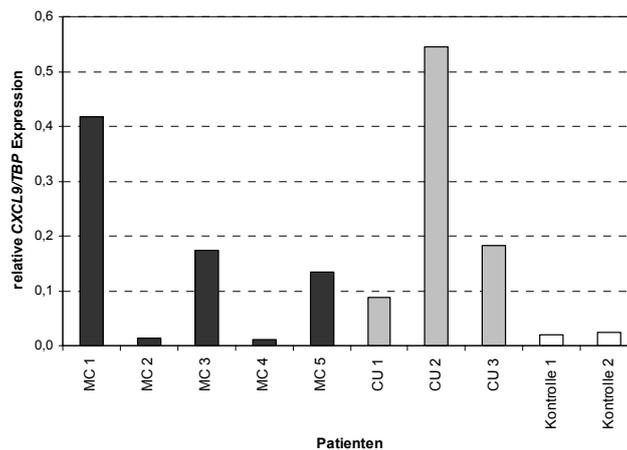


Abb. 3.2 Relative Genexpression des Kandidatengens *CXCL9* im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen

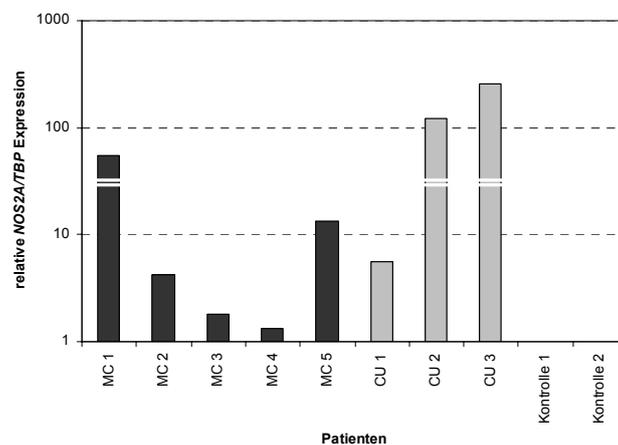


Abb. 3.3 Relative Genexpression der Positivkontrolle *NOS2A* im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen

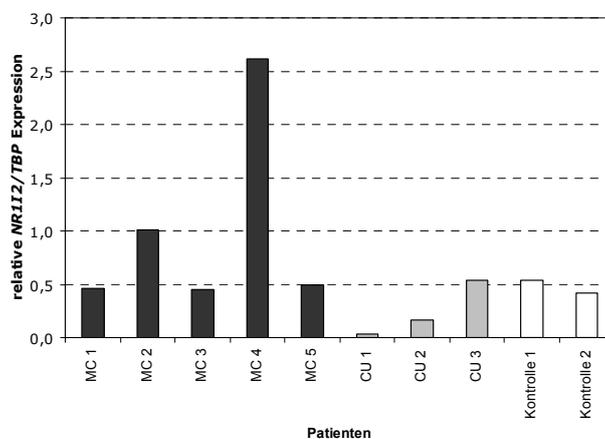


Abb. 3.4 Relative Genexpression des Gens *NR1I2* im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen

3.2 Ergebnisse der DNA-Isolation

Wie in Abschnitt 2.7.2 beschrieben, wurden die isolierten DNA-Proben auf ihre Amplifizierbarkeit hin überprüft. Im Vergleich von drei Primerpaaren zeigte sich eine durchweg gute Amplifizierbarkeit aller fünf DNA-Proben mit den drei verwendeten Primerpaaren. Die deutlichsten Banden ohne Verunreinigung zeigte *IFNG* (Abb. 3.5). Diese Primer wurden anschließend zur Kontrolle der Amplifizierbarkeit aller 152 isolierten DNA-Proben verwendet. Als Beispiel für das Testergebnis zeigt Abb. 3.6 das UV-Bild von 48 überprüften DNA-Proben aus der Kontrollgruppe.

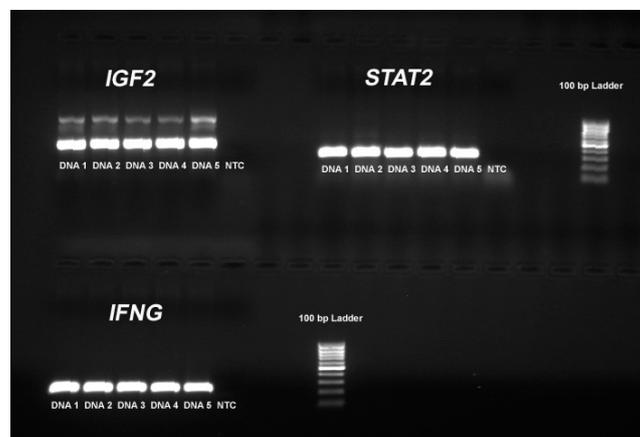


Abb. 3.5 Gelelektrophorese zur Ermittlung des besten Primers für die Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Proben

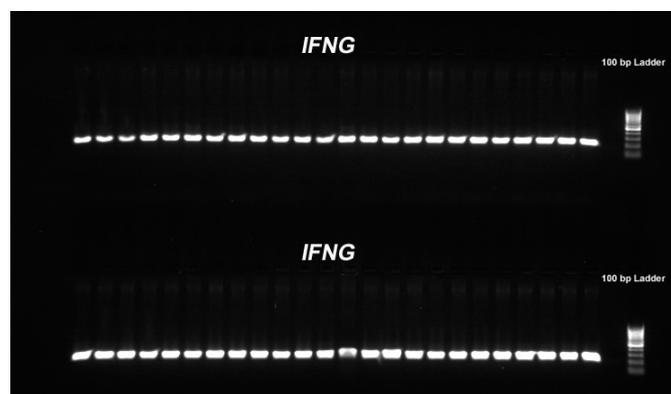


Abb. 3.6 Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Proben mit *IFNG* Primern

3.3 Ergebnisse der Reaktionsvolumenbestimmung

Für die Etablierung des TaqMan Genotyping Assays musste im Vorfeld ein geeignetes Reaktionsvolumen bestimmt werden. Dieses Volumen sollte dem Anspruch eines optimalen Reaktionsverhältnisses aller Reagenzien bei gleichzeitig niedrigem Verbrauch derselben gerecht werden. Dazu wurden vier Reaktionsvolumina von jeweils 10 µl, 15 µl, 20 µl und 25 µl getestet (Abschn. 2.7.3).

Im Reaktionsansatz mit 10 µl Volumen wichen die Kurvenverläufe um fast zwei Zyklen (Differenz der ct-Werte: 1,93) voneinander ab, sodass dieses Volumen für die weiteren Experimente als zu gering eingestuft wurde. Bei einem Reaktionsvolumen von 25 µl war die Streubreite der Werte ebenfalls größer als 1 (Differenz der ct-Werte: 1,32).

In den Reaktionsansätzen mit 20 µl und 15 µl lagen die ct-Werte der beiden getesteten DNA-Proben am dichtesten beieinander (Tab. 3.2). Um Reagenzien einzusparen, wurde deshalb im weiteren Verlauf mit einem Reaktionsvolumen von 15 µl gearbeitet.

Tab. 3.2 ct-Werte der Reaktionsvolumenbestimmung

DNA-Probe	ct-Wert (threshold: 202)	Differenz der ct-Werte
DNA 1 (25 µl)	26,23	1,32
DNA 2 (25 µl)	27,55	
DNA 1 (20 µl)	26,81	0,35
DNA 2 (20 µl)	27,16	
DNA 1 (15 µl)	27,92	0,56
DNA 2 (15 µl)	27,36	
DNA 1 (10 µl)	30,64	1,93
DNA 2 (10 µl)	28,71	

3.4 Ergebnisse der SNP-Analyse der Allelvariante rs2276886 im Gen CXCL9

In einer Assoziationsstudie stellten Zhang et al. einen Zusammenhang des SNP rs2276886 mit allergischer Rhinitis bei Kindern fest (Zhang J et al. (2005)). Aufgrund der verwandten Pathomechanismen allergischer und autoimmunologischer Erkrankungen schien eine Assoziation des SNP rs2276886 mit CED ebenfalls möglich.

Für die Gruppe der Kinder mit CED im allgemeinen und für die Kinder mit M. Crohn im speziellen zeigte sich in der eigenen SNP-Analyse ein statistisch hoch signifikanter Unterschied in der Allelverteilung im Sinne eines häufigeren Vorkommens des Minorallels A in der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,048$ bzw. $p = 0,015$; Tab. 3.3). Ebenfalls wies die Verteilung der Genotypen unter den Kindern mit M. Crohn ($p = 0,014$) im Vergleich zur Kontrollgruppe eine statistische Signifikanz auf (Tab. 3.4). Bei der nach Geschlechtern getrennten Analyse der Allelfrequenzen und Genotypen war kein Unterschied erkennbar (Tab. 3.5, Tab. 3.6) Die statistische Auswertung der Kinder mit M. Crohn im Verhältnis zur Kontrollgruppe bezüglich spezifischer Krankheitsphänotypen zeigte keine signifikanten Unterschiede der Allelvariante rs2276886 (Tab. 3.7).

Tab. 3.3 Allelverteilung des SNP rs2276886 im Gen CXCL9 bei CED, MC, CU und CI

Gruppe	Allel	Patienten	Kontrollen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	G	176 (77,2 %)	165 (68,8 %)	0,650	0,430 – 0,982	0,048
	A	52 (22,8 %)	75 (31,3 %)			
MC	G	125 (80,1 %)	165 (68,8 %)	0,546	0,338 – 0,881	0,015
	A	31 (19,9 %)	75 (31,3 %)			
CU	G	46 (71,9 %)	165 (68,8 %)	0,861	0,468 – 1,584	0,651
	A	18 (28,1 %)	75 (31,3 %)			
CI	G	5 (62,5 %)	165 (68,8 %)	1,320	0,307 – 5,668	0,486 *
	A	3 (37,5 %)	75 (31,3 %)			

* einseitiger (one-tailed) p-Wert

Tab. 3.4 Genotypenverteilung des SNP rs2276886 im Gen *CXCL9* bei CED, MC, CU und CI

Gruppe	Genotyp	Patienten	Kontrollen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	GG	69 (60,5 %)	55 (45,8 %)	1,000		0,080
	GA	38 (33,3 %)	55 (45,8 %)	0,551	0,320 – 0,949	
	AA	7 (6,1 %)	10 (8,3 %)	0,558	0,199 – 1,561	
MC	GG	52 (66,7 %)	55 (45,8 %)	1,000		0,014
	GA	21 (26,9 %)	55 (45,8 %)	0,404	0,215 – 0,758	
	AA	5 (6,4 %)	10 (8,3 %)	0,529	0,169 – 1,651	
CU	GG	16 (50,0 %)	55 (45,8 %)	1,000		0,954
	GA	14 (43,8 %)	55 (45,8 %)	0,875	0,390 – 1,965	
	AA	2 (6,3 %)	10 (8,3 %)	0,688	0,137 – 3,464	
CI	GG	1 (25,0 %)	55 (45,8 %)	1,000		0,729
	GA	3 (75,0 %)	55 (45,8 %)	3,000	0,303 – 29,740	
	AA	0 (0,0 %)	10 (8,3 %)	0,000	0,000 – NaN *	

* not a number (keine Zahl)

Tab. 3.5 Allelverteilung des SNP rs2276886 im Gen *CXCL9* bei Mädchen und Jungen

Gruppe	Allel	Mädchen	Jungen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	G	62 (72,1 %)	114 (80,3 %)	1,576	0,842 – 2,950	0,192
	A	24 (27,9 %)	28 (19,7 %)			

Tab. 3.6 Genotypenverteilung des SNP rs2276886 im Gen *CXCL9* bei Mädchen und Jungen

Gruppe	Genotyp	Mädchen	Jungen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	GG	24 (55,8 %)	45 (63,4 %)	1,000		0,184
	GA	14 (32,6 %)	24 (33,8 %)	1,094	0,480 – 2,495	
	AA	5 (11,6 %)	2 (2,8 %)	4,688	0,845 – 25,996	

Tab. 3.7 Subgruppenanalyse des SNP rs2276886 verschiedener Phänotypen bei Kindern mit M. Crohn

Phänotypen	Allelvariabilität (p-Wert)	Genotypenvariabilität (p-Wert)
Befall des oberen Gastrointestinaltrakts	0,492	0,519
Ileumbefall	0,500	0,400
Kolonbefall	0,461	0,569
Anusbefall	1,000	1,000
Fistelbildung	0,216	0,237
Stenose	0,314	0,347
Operation	0,629	0,804
extraintestinale Symptome	1,000	0,654
familiäre Häufung von MC	0,649	0,115

3.5 Ergebnisse der SNP-Analyse der Allelvariante rs3814055 im Gen *NR1I2*

Eine Assoziation des SNP rs3814055 mit CED wurde in der Studie von MM Dring et al. postuliert (Dring MM et al. (2006)). Beim Vergleich der Allelfrequenzen und Genotypen des SNP rs3814055 zwischen 114 erkrankten Kindern und 120 Kontrollen in der Untersuchungsgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3.8, Tab. 3.9). Auch zwischen Mädchen und Jungen innerhalb der Patientengruppe ließen sich keine statistisch signifikante Assoziation zum SNP rs3814055 feststellen (Tab. 3.10, Tab. 3.11). Bei den Kindern mit M. Crohn zeigte sich ebenfalls keine signifikante Assoziation des SNP rs3814055 mit bestimmten Phänotypen der Erkrankung (Tab. 3.12).

Tab. 3.8 Allelverteilung des SNP rs3814055 im Gen *NR1I2* bei CED, MC, CU und CI

Gruppe	Allel	Patienten	Kontrollen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	C	141 (61,8 %)	143 (59,6 %)	0,910	0,628 – 1,319	0,637
	T	87 (38,2 %)	97 (40,4 %)			
MC	C	94 (60,3 %)	143 (59,6 %)	0,972	0,644 – 1,467	0,917
	T	62 (39,7 %)	97 (40,4 %)			
CU	C	42 (67,7 %)	143 (59,6 %)	0,702	0,389 – 1,269	0,247
	T	20 (32,3 %)	97 (40,4 %)			
CI	C	5 (82,5 %)	143 (59,6 %)	0,885	0,207 – 3,788	1,000
	T	3 (37,5 %)	97 (40,4 %)			

Tab. 3.9 Genotypenverteilung des SNP rs3814055 im Gen *NR1I2* bei CED, MC, CU und CI

Gruppe	Genotyp	Patienten	Kontrollen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	CC	43 (37,7 %)	36 (30,0 %)	1,000		0,245
	CT	55 (48,2 %)	71 (59,2 %)	0,649	0,368 – 1,142	
	TT	16 (14,0 %)	13 (10,8 %)	1,030	0,438 – 2,424	
MC	CC	28 (35,9 %)	36 (30,0 %)	1,000		0,322
	CT	38 (48,7 %)	71 (59,2 %)	0,688	0,366 – 1,294	
	TT	12 (15,4 %)	13 (10,8 %)	1,187	0,470 – 2,999	
CU	CC	13 (41,9 %)	36 (30,0 %)	1,000		0,497
	CT	16 (51,6 %)	71 (59,2 %)	0,624	0,271 – 1,438	
	TT	2 (6,5 %)	13 (10,8 %)	0,426	0,085 – 2,149	
CI	CC	2 (50,0 %)	36 (30,0 %)	1,000		0,223
	CT	1 (25,0 %)	71 (59,2 %)	0,254	0,022 – 2,891	
	TT	1 (25,0 %)	13 (10,8 %)	1,385	0,116 – 16,582	

Tab. 3.10 Allelverteilung des SNP rs3814055 im Gen *NR1I2* bei Mädchen und Jungen

Gruppe	Allel	Mädchen	Jungen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	C	51 (59,3 %)	90 (63,4 %)	1,188	0,686 – 2,057	0,575
	T	35 (40,7 %)	52 (36,6 %)			

Tab. 3.11 Genotypenverteilung des SNP rs3814055 im Gen *NR1I2* bei Mädchen und Jungen

Gruppe	Genotyp	Mädchen	Jungen	OR	95 % KI	p-Wert
CED	CC	15 (34,9 %)	28 (39,4 %)	1,000		0,805
	CT	21 (48,8 %)	34 (47,9 %)	1,153	0,503 – 2,645	
	TT	7 (16,3 %)	9 (12,7 %)	1,452	0,451 – 4,678	

Tab. 3.12 Subgruppenanalyse des SNP rs3814055 verschiedener Phänotypen bei Kindern mit M. Crohn

Phänotypen	Allelvariabilität (p-Wert)	Genotypenvariabilität (p-Wert)
Befall des oberen Gastrointestinaltrakts	0,350	0,388
Ileumbefall	0,360	0,615
Kolonbefall	0,849	0,937
Anusbefall	1,000	0,877
Fistelbildung	0,547	0,746
Stenose	0,146	0,311
Operation	0,246	0,414
extraintestinale Symptome	0,161	0,380
familiäre Häufung von MC	0,712	0,186

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Kandidatengene und *NOS2A* als Positivkontrolle der Expressionsmessungen

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Genexpressionsarray wurden 88 Gene im Kolongewebe erkrankter Kinder und gesunder Kontrollen untersucht. Dabei wurden sieben Gene ermittelt, die im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe überexprimiert waren (Tab. 3.1). Die sechs Gene *FOXA2* ((Zheng W et al. (2006)), *IL1A* (Brynskov J et al. (1991); Ludwiczek O et al. (2004)), *JAK3* (Mitsuyama K et al. (2001); Murata Y et al. (2002)), *NOS2A* (Gupta SK (1998); Kolios G et al. (2004); Oliver et al. (2006); Martín MC et al. (2007)), *STAT1* (Mitsuyama K et al. (2001); Schreiber S et al. (2002)) und *TNF* (Tremelling M et al. (2006); Ferguson LR et al. (2008); Matsuda R et al. (2008)) waren bereits im Zusammenhang mit CED bei Erwachsenen oder in entsprechenden tierexperimentellen Studien untersucht worden. Die Expression von *CXCL9* hingegen wurde bisher weder bei Patienten mit *C. ulcerosa* noch mit *M. Crohn* untersucht, und auch Assoziationsstudien zwischen SNPs in *CXCL9* und CED wurden noch nicht durchgeführt. Da gezeigt werden konnte, dass die Variante rs2276886 von *CXCL9* mit allergischer Rhinitis bei Kindern assoziiert ist und atopischen Erkrankungen, ähnlich wie dem *M. Crohn* oder der *C. ulcerosa*, autoimmunologische Fehlregulationen zugrunde liegen, wurde dieser SNP im eigenen Kollektiv evaluiert, zumal *CXCL9* im Kolongewebe der Patientengruppe überexprimiert war (Zhang J et al. (2005)).

Nitric oxide synthase 2A (*NOS2A*) wurde in allen Expressionsanalysen als Positivkontrolle mitbestimmt, da es in den Kolonproben der Untersuchungsgruppe stark überexprimiert war (Abb. 3.3), was mit aktuellen Literaturdaten übereinstimmt (Gupta SK (1998); Kolios G et al. (2004)). Von der Nitric oxide synthase (NOS) sind die drei Isoformen **neuronal NOS** (nNOS, NOS1), **inducible NOS** (iNOS, NOS2) und **endothelial NOS** (eNOS, NOS3) bekannt, welche das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO) produzieren (Andrew PJ & Mayer B (1999)).

Stickstoffmonoxid hemmt die Adhäsion und Aggregation von Leukozyten und Thrombozyten, dämpft die Mastzellaktivität und verbessert die mukosale Perfusion. Hierdurch wird der oxidativen Stress reduziert und die intestinale Entzündungsreaktion gehemmt (Kolios G et al. (2004)). Eine vermehrte Produktion von

NO im Kolongewebe bzw. die Überexpression von *NOS2A* in der Kolonschleimhaut der untersuchten CED-Patienten kann demnach als antiinflammatorische Reaktion interpretiert werden.

Im Sinne einer Replikationsstudie wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin ein SNP im Gen *NR1I2* untersucht, das eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der mukosalen Integrität, bei der Detoxifikation und bei der Biotransformation körperfremder Substanzen spielt. Kürzlich wurde eine Assoziation der Variante rs3814055 von *NR1I2* mit CED bei Erwachsenen beschrieben (Dring MM et al. (2006)). Zusätzlich wurde die Genexpression von *NR1I2* im Kolongewebe der eigenen Patienten bestimmt.

4.2 Die Bedeutung von *CXCL9* in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

4.2.1 Interaktion von Chemokinen und T-Zellen bei chronischen Entzündungsprozessen

Chemokine bilden eine Gruppe von über 40 Proteinen, die den Zytokinen zugeordnet werden. Je nach strukturellem Aufbau und der Anordnung der Cysteinmoleküle in der Nähe des N-Terminus werden Chemokine in die vier Hauptgruppen CXC, CC, C und CX₃C unterteilt (Abb. 4.1). Die Benennung eines Chemokins entspricht dem Namen der Hauptgruppe, der das Chemokin angehört, und wird mit dem Buchstaben L (für Ligand) und einer Nummer versehen. Auch die Chemokinrezeptoren werden entsprechend der Hauptgruppe benannt und durch den Buchstaben R (für Rezeptor) und eine Nummer gekennzeichnet (Zlotnik A & Yoshie O (2000)).

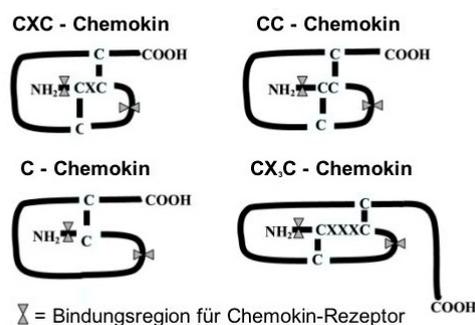


Abb. 4.1 Chemokin-Familien nach Townson DH & Liptak AR (2003)

Wie Abb. 4.2 verdeutlicht, haben Chemokine sehr unterschiedliche Funktionen. Sie spielen u. a. eine wichtige Rolle in der Entwicklung lymphatischer Organe, bei der Differenzierung von T- und B-Lymphozyten, bei immunologischen und proinflammatorischen Prozessen, bei der Wundheilung und bei der Angiogenese und Angiostase (Rossi D & Zlotnik A (2000)).

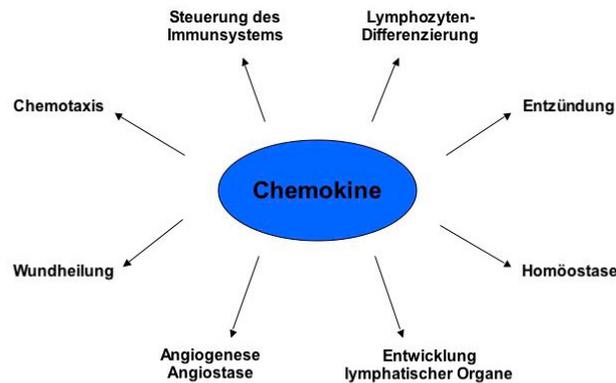


Abb. 4.2 Funktionen der Chemokine modifiziert nach Rossi D & Zlotnik A (2000)

Ihre Funktion vermitteln Chemokine über Rezeptoren mit sieben Transmembransegmenten, die als 7-Transmembranrezeptoren (7TMR) bezeichnet werden und an G-Proteine gekoppelt sind (Murdoch C & Finn A (2000)). Zielzellen der Chemokine sind hämatopoetische Zellen, Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen, neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Tumor-infiltrierende Lymphozyten und Epithelzellen (Townson DH & Liptak AR (2003)).

Antigenpräsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen triggern im Rahmen proinflammatorischer Reaktionen durch Freisetzung von Zytokinen die Aktivierung und Differenzierung von T-Lymphozyten. In der Folge kommt es zu einem Übergewicht autoreaktiver T-Lymphozyten und zu einer Dysbalance zwischen antigenpräsentierenden Zellen, regulatorischen T-Zellen und den verschiedenen Subtypen der T-Lymphozyten (Th1, Th2 und Th17) und den von diesen freigesetzten Zytokinen (Sanchez-Munoz F et al. (2008)).

Der M. Crohn und die C. ulcerosa sind durch eine massive Leukozyteninfiltration der intestinalen Mukosa gekennzeichnet. Epithelzellen exprimieren eine Reihe von

CXC und CC Chemokine, welche Leukozyten zur Migration in das entzündete Gewebe anregen (Papadakis KA & Targan SR (2000)). Insbesondere Chemokine der Gruppe CXC und CC attrahieren neutrophile Granulozyten und Monozyten in entzündlich verändertes Gewebe (Viola A & Luster AD (2008)). Tierexperimentelle Studien an Mäusen konnten zeigen, dass CXCL9, welches in der eigenen Studie überexprimiert war, einen Einfluss auf Entzündungsreaktionen und auf die Induktionsphase chronisch entzündlicher Darmerkrankungen hat (Scheerens H et al. (2001)). Die Chemokine CXCL9, CXCL10 und CXCL11 sind Liganden der Rezeptoren CXCR3 und CCR3. Während der Rezeptor CCR3 vorwiegend auf Zellmembranen von Th2-Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten lokalisiert ist, wird der Rezeptor CXCR3 auf der Oberfläche von Th1-Lymphozyten exprimiert. Durch Bindung von CXCL9 an CXCR3 kommt es zu einer Aktivierung von Th1-Lymphozyten, und durch eine Bindung an CCR3 von Th2-Lymphozyten werden diese in ihrer Funktion gehemmt (Abb. 4.3). Auf diese Weise hat CXCL9 antagonistische Eigenschaften und trägt durch die gleichzeitige Aktivierung von Th1-Lymphozyten und die Suppression von Th2-Lymphozyten zu einer Dysbalance zwischen den verschiedenen Subtypen der T-Lymphozyten bei (Loetscher P et al. (2001)).

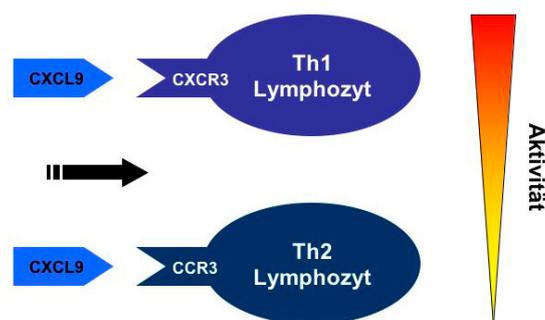


Abb. 4.3 Aktivitätsänderung von T-Lymphozyten bei Bindung von CXCL9

Sowohl in tierexperimentellen Studien mit Mäusen als auch in Untersuchungen an humanem Kolongewebe konnte gezeigt werden, dass Th1-Lymphozyten einen wesentlichen Anteil an der Induktion eines M. Crohn haben und zur intestinalen Epithelschädigung und Entzündungsreaktion beitragen (Elson CO et al. (1996); Parronchi P et al. (1997)).

Wenngleich eine alleinige Dominanz von Th1-Lymphozyten beim M. Crohn bzw. von Th2-Lymphozyten bei der C. ulcerosa mittlerweile umstritten ist, scheint eine Störung des Zytokingleichgewichts und eine Dysregulation von T-Lymphozyten ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese von CED zu sein (Alex P et al. (2008)).

4.2.2 Bewertung der Genexpression von CXCL9 im Kolongewebe von Kindern mit CED

In der vorliegenden Genexpressionsanalyse war das Gen des Chemokine (C-X-C motif) ligand 9, welches auf dem langen Arm des Chromosoms 4 (4q21) lokalisiert ist, bei allen Kindern mit C. ulcerosa und bei drei der fünf Kinder mit M. Crohn überexprimiert (Abb. 3.2) (OMIM (2008)). Da es bislang keine Daten hinsichtlich der Expression von CXCL9 im Kolongewebe von CED-Patienten gibt, lassen sich die selbst gewonnenen Messergebnisse lediglich mit serologischen Untersuchungen, Zellstudien mit Leukozyten und tierexperimentellen Untersuchungen vergleichen.

Serologische Untersuchungen von CXCL9, CXCL10 und CXCL11 bei Patienten mit M. Crohn zeigten eine signifikante Erhöhung dieser Chemokine im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Singh UP (2007)). Dajotoy et al. konnten *in vitro* eine erhöhte Expression und Produktion von CXCL9 durch humane eosinophile Granulozyten von gesunden Individuen nach Stimulation mit dem Entzündungsmediator Interferon- γ (IFNG) nachweisen (Dajotoy T et al. (2004)). Zudem war der korrespondierende Chemokinrezeptor CXCR3 im Kolon von Patienten mit M. Crohn stark überexprimiert (Annunziato F et al. (1999)).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte in tierexperimentellen Studien festgestellt werden, dass die intestinale Expression von CXCL9 nur gering erhöht war, wenn bei genetisch veränderten Mäusen (IFNG^{-/-}) die Produktion des Entzündungsmediators IFNG blockiert war. Beim Wildtyp könnte die durch IFNG induzierte Produktion von CXCL9 eine Akkumulation von CXCR3 tragenden T-Lymphozyten zur Folge haben, wie sie häufig im Rahmen einer experimentellen Kolitis beobachtet werden kann (Ito R et al. (2006)). Dementsprechend wurde bei immundefizienten Mäusen mit experimentell induzierter Kolitis eine erhöhte Ex-

pression der mRNA von *CXCR3* und *CXCL9* beobachtet (Kristensen NN et al. (2006)).

Indem *CXCL9* die Chemotaxis INFG-produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten in die Kolonmukosa fördert und INFG im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus die Expression von *CXCL9* steigert, könnte bei CED eine massive Verstärkung der intestinalen Immunreaktion durch Th1-Lymphozyten die Folge sein (Dwinell MB et al. (2001)).

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Überexpression von *CXCL9* als proinflammatorisches Chemokin chronische Entzündungsreaktionen triggern kann. Die Überexpression von *CXCL9* im Kolongewebe der Patienten unterstützt diese Hypothese, da sich bei der Mehrzahl der Kolonproben eine erhöhte Expression dieses Gens nachweisen ließ.

4.2.3 Bewertung der Allelvariante rs2276886 im Gen *CXCL9*

Die kodierende Gensequenz für *CXCL9* liegt in einem DNA-Abschnitt, auf dem vorwiegend für T-Lymphozyten spezifische Chemokine lokalisiert sind (Zlotnik A & Yoshie O (2000)). Th1-Lymphozyten sind ein wesentlicher Bestandteil der Pathogenese autoimmunologischer Erkrankungen und neueren Erkenntnissen zufolge auch von allergischen Entzündungsreaktionen (Valenta R et al. (2009)). Kürzlich wurde bei Kindern mit allergischer Rhinitis eine Assoziation der Allelvariante rs2276886 in *CXCL9* beschrieben (Zhang J et al. (2005)). Neben chronischer Arthritis tritt allergisches Asthma als häufigste Zweiterkrankung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen auf (Bernstein CN et al. (2005)). Parallelen in der Ätiologie von Autoimmunerkrankungen und atopischen Erkrankungen werden seit langem vermutet, und Fall-Kontroll-Studien haben ein signifikant häufigeres gemeinsames Auftreten von atopischen Erkrankungen und CED gezeigt (Simpson CR et al. (2002); Bernstein CN et al. (2005)). Weiterhin weisen atopische und autoimmunologische Erkrankungen Assoziationen zu Polymorphismen (z. B. rs1077861) in *CARD15* auf, die möglicherweise ursächlich für eine Dysregulation der Immunabwehr sind (Weidinger S et al. (2005)).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei Trägern des Minorallels A von rs2276886 im Vergleich zum Wildtyp ein geringeres Erkrankungsrisiko für M. Crohn (Abschn. 3.4). Man könnte daher vermuten, dass Träger dieses SNP eine veränderte Proteinaktivität oder Störungen der Interaktion zwischen dem Chemokin CXCL9 und dem Rezeptor CXCR3 aufweisen. Somit könnte die Aktivierung immunregulatorischer Chemokine und T-Lymphozyten verhindert und eine abgeschwächte Entzündungsreaktion die Folge sein.

Bei getrennter Betrachtung von M. Crohn und *C. ulcerosa* kam der risikosenkende Einfluss nur beim M. Crohn zum Tragen (Tab. 3.3, Tab. 3.4). Da es sich hierbei um die größte Patientengruppe handelte, ist nicht auszuschließen, dass größere Patientenzahlen auch bei *C. ulcerosa* zu einem statistisch signifikanten Ergebnis geführt hätten. Möglicherweise spielen die Veränderungen aber auch nur beim M. Crohn eine Rolle, weil Th1-Lymphozyten bei dieser Erkrankung einen größeren Einfluss auf die Pathogenese haben als bei der *C. ulcerosa* (Abschn. 4.2.1).

Es konnte keine Assoziation der Allelvariante rs2276886 mit bestimmten Phänotypen von M. Crohn festgestellt werden (Tab. 3.7). Aus diesem Grund lässt sich eine Störung der Entzündungskaskade zu einem sehr frühen Zeitpunkt vermuten. Dementsprechend wären die Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf im allgemeinen zwar verändert, aber es ließe sich kein spezieller Krankheitsphänotyp aus dem SNP rs2276886 in *CXCL9* vorhersagen.

4.3 Die Bedeutung von *NR1/2* in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

4.3.1 Die Rolle von *NR1/2* bei Detoxifikationsprozessen des menschlichen Immunsystems

Das Gen *NR1/2* auf Chromosom 3q13 kodiert den Nuclear pregnane X receptor (PXR) (OMIM (2008)). Der PXR gehört als Steroidhormonrezeptor zur Familie der Kernrezeptoren (nuclear receptor). Alle Rezeptoren dieser Gruppe besitzen eine DNA-Bindungsdomäne (**DBD**) mit zwei Zinkfinger-Domänen zur Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, eine Liganden-Bindungsdomäne (**LBD**) für Hormon- und Proteinbindung am Carboxy-terminalen Ende und eine weitere Bindungsdomäne am N-terminalen Ende zur Transaktivierung der Transkription (Abb. 4.4)

(Kumar R & Thompson EB (1999)). In diesem Bereich des Rezeptors ist auch eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (**AF-1**) lokalisiert.

Eine weitere Liganden-abhängige Aktivierungsfunktion (**AF-2**) liegt im Bereich der LBD am Carboxy-terminalen Ende. Die Mehrzahl der Kernrezeptoren weist mindestens diese zwei Aktivierungsdomänen auf (Wärnmark A et al. (2003)). Eine für die Liganden-abhängige Transaktivierung notwendige Domäne innerhalb der Aktivierungsfunktion AF-2 ist die AF-2-Aktivierungsdomäne (**AF-2 AD**). Weitere Bestandteile der Kernrezeptoren sind eine **Hinge-Domäne** als Verbindung zwischen DNA-Bindungsdomäne und Liganden-Bindungsdomäne sowie eine **variabel auftretende Domäne** am C-terminalen Ende (Bourguet W et al. (2000)).

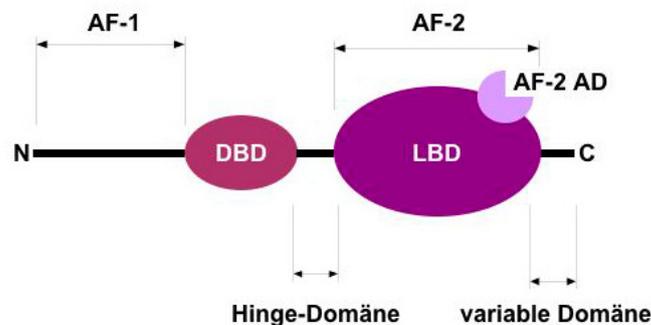


Abb. 4.4 Aufbau eines Kernrezeptors modifiziert nach Bourguet W et al. (2000)

Zu den Liganden des PXR gehört eine Vielzahl natürlicher endogener und synthetischer exogener Steroide wie Pregnenolon, Progesteron und Dexamethason (Kliwer SA et al. (1998)). Die Funktion des Rezeptors besteht in einer Aktivierung von Monooxygenasen der Familie Cytochrom P-450 (CYP), einer Gruppe von Enzymen, die maßgeblich am Stoffwechsel und an der Biotransformation und Entgiftung unterschiedlicher Substanzen wie biogenen Aminen, Kortikosteroiden, Prostaglandinen, Leukotrienen, Medikamenten und chemischen Noxen beteiligt sind (Nelson DR et al. (1996)). Auch Cytochrome P-450 subfamily IIIA (CYP3A), das in der Leber und in der Schleimhaut des Dünndarms exprimiert wird und durch seine hohe Biotransformationskapazität einen wesentlichen Bestandteil des First-pass-Effekts darstellt, wird durch den PXR aktiviert (Lamba JK et al. (2002)). Daneben reguliert der PXR als Transkriptionsfaktor auch die Genexpression von

MDR1, Cytochrome P-450 subfamily IIB (*CYP2B*), Cytochrome P-450 subfamily IIC (*CYP2C*) und Organic anion transporter 2 (*OATP2*) (Goodwin B et al. (2002)).

Damit nimmt der PXR eine Schlüsselfunktion in der Aktivierungskaskade der körpereigenen Detoxifikations- und Abwehrreaktionen ein. Steht PXR nicht als Ligand für die Aktivierung dieser Immunreaktionen zur Verfügung, kann es zu einem Verlust der detoxifizierenden Eigenschaften, zur Schädigung der intestinalen Epithelzellen und zur Darminflammation kommen (Roediger WE & Babidge W (1997)).

4.3.2 Bewertung der Genexpression von *NR1I2* im Kolongewebe von Kindern mit CED

Obwohl als Replikation der Studie von Dring et al. im eigenen pädiatrischen Patientenkollektiv die Allelvariante rs3814055 analysiert werden sollte, wurde in der vorliegenden Arbeit zuvor die Genexpression von *NR1I2* im Kolongewebe der Kinder mit CED untersucht (Dring MM et al. (2006)). Langmann et al. hatten bereits im Kolongewebe von erwachsenen Patienten mit *C. ulcerosa* eine Herunterregulierung des PXR kombiniert mit einer signifikanten Unterexpression detoxifizierender Enzyme nachgewiesen. Dies zeigte sich jedoch nur im Kolon und nicht im Ileum. Beim M. Crohn war dieser Unterschied im Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe zudem weniger ausgeprägt als bei der *C. ulcerosa* (Langmann T et al. (2004)).

In den gewonnenen Messergebnissen war die Expression von *NR1I2* im Kolongewebe von Patienten und Kontrollen nahezu gleich, bei zwei der fünf Kinder mit M. Crohn jedoch stark überexprimiert (Abb. 3.4). Aufgrund der kleinen Untersuchungsgruppe widerlegt die eigene Expressionsmessung nicht, dass der PXR eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Mukosaintegrität und bei der Detoxifikation trägt. Allerdings wäre bei Patienten mit M. Crohn eine Unter- und keine Überexpression von *NR1I2* im Kolon zu erwarten gewesen, welche durch eine gestörte zelluläre Detoxifikation zur Darminflammation führt.

Eine mögliche Erklärung für die im Vergleich zu Langmann et al. unterschiedlichen Messergebnisse ist, dass die Darmgewebeproben der eigenen Genexpressionsanalyse aus entzündeten Schleimhautarealen stammten (Langmann T

et al. (2004)). Aufgrund von unterschiedlichen molekularbiologischen und biochemischen Reaktionen in inflammatorisch verändertem Gewebe lassen sich die Messergebnisse darum nicht direkt mit Expressionsmessungen aus den gesunden Schleimhautarealen vergleichen, die in der Studie von Langman et al. verwendet wurden (Langmann T et al. (2004)). Weiterhin können die widersprüchlichen Messergebnisse auf grundlegend unterschiedlichen intestinalen Genexpressionsmustern zwischen Kindern und Erwachsenen beruhen.

4.3.3 Bewertung der Allelvariante rs3814055 im Gen *NR1I2*

Bei dem SNP rs3814055 in *NR1I2* handelt es sich um einen Basenaustausch in der Promoterregion des Gens, der in einer SNP-Analyse unter 422 erwachsenen CED-Patienten und 350 Kontrollpersonen aus Irland eine signifikante Assoziation mit *M. Crohn* und *C. ulcerosa* zeigte (Zhang J et al. (2001); Dring MM et al. (2006)).

In der eigenen SNP-Analyse konnten keine signifikanten Unterschiede des SNP rs3814055 zwischen Kindern mit CED und Kontrollen nachgewiesen werden (Abschn. 3.5). Auch bei getrennter Betrachtung von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* sowie beim Vergleich verschiedener Phänotypen fanden sich keine Unterschiede. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen damit sowohl mit einer schottischen Studie von Ho et al. im Einklang, die bei erwachsenen Patienten keine Assoziation der Allelvariante rs3814055 mit CED, *C. ulcerosa* oder *M. Crohn* nachweisen konnte, als auch mit einer spanischen Studie unter 696 CED-Patienten und 550 Kontrollpersonen, welche ebenfalls keine Assoziation zeigte (Ho GT et al. (2006); Martínez A et al. (2007)). In der spanischen Studie von Martínez et al. fand sich in einer Subgruppe von Patienten mit *C. ulcerosa* und extensiver Kolitis eine Assoziation mit der Allelvariante rs3814055. Auch die Assoziation mit dieser Subgruppe konnte in den eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden, da die Zahl der Patienten mit Pankolitis, gemessen an der Studie von Martínez et al., zu gering war (Martínez A et al. (2007)). Die Gründe dafür, dass in einigen Studien eine Assoziation des SNP rs3814055 bei erwachsenen CED-Patienten festgestellt werden konnte (Dring MM et al. (2006)) und in anderen nicht (Ho GT et al. (2006); Martínez A et al. (2007)), liegt möglicherweise in unklaren Kriterien bei der Einteil-

lung der untersuchten Populationen, in der genetischen Variabilität von *NR1I2* und in statistischen Fehlern begründet (Ho GT et al. (2006)).

Erste Hinweise auf eine Assoziation der Region 3q mit CED wurden bereits vor mehr als zehn Jahren gefunden und in den folgenden Jahren bestätigt (Cho JH et al. (1998); van Heel DA et al. (2003); van Heel DA et al. (2004)). Auch eine jüngere Studie unter 904 verwandten CED-Patienten postulierte eine starke Assoziation von Chromosom 3q mit M. Crohn (Achkar JP et al. (2006)). In aktuellen genomweiten Analysen wurde der Genlocus Chromosom 3q im Hinblick auf eine Assoziation mit CED jedoch als weniger relevant bewertet (Rioux JD et al. (2007); Barrett JC (2008); Cho JH (2008)). Da bislang mehr als sechzig SNPs innerhalb des Gens *NR1I2* beschrieben wurden, lassen sich aus der alleinigen Untersuchung der Allelvariante rs3814055 möglicherweise keine Rückschlüsse auf pathologische Auswirkungen bei CED ziehen (King CR et al. (2007)). Die Überprüfung in einer größeren pädiatrischen Patientengruppe ist jedoch erforderlich, um eine abschließende Bewertung hinsichtlich der Rolle des SNP rs3814055 treffen zu können.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die mRNA des proinflammatorischen Chemokins *CXCL9* im Kolongewebe von Kindern mit *C. ulcerosa* und bei drei von fünf Kindern mit M. Crohn überexprimiert war und dass der SNP rs2276886 in *CXCL9* eine protektive Rolle in der Pathogenese des M. Crohn spielt. Weitergehende Untersuchungen werden nötig sein, um diese Daten zu bestätigen und die Bedeutung von *CXCL9* in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu definieren. Eine abschließende Bewertung des PXR in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen im Kindesalter scheint zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich zu sein. Aufgrund der genetischen Variabilität von *NR1I2* in der Gesamtbevölkerung sind größere Untersuchungsgruppen und weitere Studien erforderlich.

Es ist eine positive Entwicklung, dass die Durchführung von Genotypisierungen einfacher und kostengünstiger geworden ist. Die Aussagekraft einzelner Polymorphismen scheint jedoch häufig begrenzt zu sein, und die Identifizierung phar-

makogenetisch relevanter Kandidatengene der im großen Stil betriebenen Genotypisierung hinterherzuhinken (Johnson AD et al. (2005)). Da ein einzelner Polymorphismus noch keine Aussage über die Funktion des Gens macht, sind vor allem funktionelle Untersuchungen von neuen Kandidatengenen und deren Definition in der Pathogenese von CED nötig. Bei der in dieser Arbeit zitierten Literatur fanden sich nur wenige Studien mit einem Ergebnis, das einen direkten klinischen Nutzen für die Patienten und Ärzte haben könnte. Insofern ist es nicht sinnvoll, Assoziationsstudien mit Polymorphismen anzustrengen, ohne vorher die Relevanz des SNP im betreffenden Gen zu überprüfen.

So bleibt zu hoffen, dass es in Zukunft gelingen wird, Daten aus genetischen Untersuchungen mit funktionellen Untersuchungen zu verifizieren, um die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen haben einen multifaktoriellen Ursprung. Dabei scheinen genetische Faktoren eine entscheidende Rolle zu spielen und Einfluss auf den Krankheitsverlauf und unterschiedliche Erkrankungsmuster zu haben. Insbesondere bei Kindern ist eine genetische Disposition in der Pathogenese von CED anzunehmen.

Um weitere Suszeptibilitätsgene zu identifizieren, wurde die mRNA-Expression von 88 Genen im Kolongewebe von Kindern mit CED mit gesunden Kontrollen verglichen. Dabei zeigte sich eine deutliche Überexpression von *CXCL9* bei Patienten mit M. Crohn und C. ulcerosa. Die Expressionsmessungen von *NR1I2* zeigten nur geringe Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Für beide Gene wurde eine SNP-Analyse der Allelvarianten rs2276886 bzw. rs3814055 bei 114 Kindern mit CED und 120 erwachsenen Kontrollpersonen durchgeführt. Dabei wurde ein signifikant häufigeres Auftreten des SNP rs2276886 in *CXCL9* bei allen Kindern mit M. Crohn ($p = 0,016$) festgestellt. Der SNP rs3814055 im Gen *NR1I2* zeigte keine Assoziation mit CED im Kindesalter.

Die vorliegende Studie ist die erste Untersuchung zur Genexpression von *CXCL9* und *NR1I2* im Kolongewebe bei M. Crohn und C. ulcerosa im Kindesalter. Auch die Allelvarianten rs2276886 und rs3814055 in beiden Genen wurden erstmals bei Kindern mit CED untersucht.

Ein Zusammenhang zwischen CED im Kindesalter und der Expression von *NR1I2* im Kolongewebe und dem SNP rs3814055 konnte nicht gefunden werden. Die deutliche Überexpression von *CXCL9* und die signifikante Assoziation des SNP rs2276886 mit M. Crohn lassen jedoch eine Rolle dieses Gens in der Pathogenese von CED im Kindesalter vermuten.

Literaturverzeichnis

Abdel-Hady M & Bunn SK (2004) Inflammatory bowel disease. *Current Paediatrics*. 2004; 14 (7): 598 – 604.

Abdul-Baki H, ElHajj I, El-Zahabi LM, Azar C, Aoun E, Zantout H, Nasreddine W, Ayyach B et al. (2007) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease in Lebanon. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Apr; 13 (4): 475 – 480. PMID: 17206720.

Achkar JP, Dassopoulos T, Silverberg MS, Tuvlin JA, Duerr RH, Brant SR, Siminovitch K, Reddy D et al. (2006) Phenotype-stratified genetic linkage study demonstrates that IBD2 is an extensive ulcerative colitis locus. *The American journal of gastroenterology*. 2006 Mar; 101 (3): 572 – 580. PMID: 16542294.

Ahmad T, Satsangi J, McGover D, Bunce M, Jewell DP (2001) Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2001 Jun; 15 (6): 731 – 748. PMID: 11380312.

Ahmed SF, Wong JS, McGrogan P (2007) Improving growth in children with inflammatory bowel disease. *Hormone research*. 2007; 68 Suppl 5: 117 – 121. PMID: 18174726.

Alex P, Zachos NC, Nguyen T, Gonzales L, Chen TE, Conklin LS, Centola M, Li X (2008) Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Mar; 15 (3): 341 – 352. PMID: 18942757.

Al-Ghamdi AS, Al-Mofleh IA, Al-Rashed RS, Al-Amri SM, Aljebreen AM, Isnani AC, El-Badawi R (2004) Epidemiology and outcome of Crohn's disease in a teaching hospital in Riyadh. *World journal of gastroenterology*. 2004 May 1; 10 (9): 1341 – 1344. PMID: 15112355.

Al-Shamali MA, Kalaoui M, Patty I, Hasan F, Khajah A, Al-Nakib B (2003) Ulcerative colitis in Kuwait: a review of 90 cases. *Digestion*. 2003; 67 (4): 218 – 224. PMID: 12966229.

Andrew PJ & Mayer B (1999) Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. 1999 Aug 15; 43 (3): 521 – 531. PMID: 10690324.

Annunziato F, Cosmi L, Galli G, Beltrame C, Romagnani P, Manetti R, Romagnani S, Maggi E (1999) Assessment of chemokine receptor expression by human Th1 and Th2 cells in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology*. 1999 May; 65 (5): 691 – 699. PMID: 10331500.

Ballinger A (2002) Fundamental mechanisms of growth failure in inflammatory bowel disease. *Hormone research*. 2002; 58 Suppl 1: 7 – 10. PMID: 12373006.

Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, Rioux JD, Brant SR, Silverberg MS et al. (2008) Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics*. 2008 Aug; 40 (8): 955 – 962. PMID: 18587394.

Baumgart DC & Sandborn WJ (2007) Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *The Lancet*. 2007 May 12; 369: 1641 – 1657. PMID: 17499606.

Baumgart DC (2009) The Diagnosis and Treatment of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2009 Feb 20; 106 (8): 123 – 133.

Benchimol EI, Seow CH, Steinhardt AH, Griffiths AM (2008) Traditional corticosteroids for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane database of systematic reviews (Online)*. 2008 Apr 16; (2): CD006792. PMID: 18425970.

Bernstein CN, Wajda A, Blanchard JF (2005) The clustering of other chronic inflammatory diseases in inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology*. 2005 Sep; 129 (3): 827 – 836. PMID: 16143122.

Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, MacKenzie A, Koehoorn M, Jackson M, Fedorak R, Israel D et al. (2006) The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *The American journal of gastroenterology*. 2006 Jul; 101 (7) 1559 – 1568. PMID: 16863561.

Bitton A, Dobkin PL, Edwardes MD, Sewitch MJ, Meddings JB, Rawal S, Cohen A, Vermeire S, et al. (2008) Predicting relapse in Crohn's disease: a biopsychosocial model. *Gut*. 2008 Oct; 57 (10): 1386 – 1392. PMID: 18390994.

Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P (2001) Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *American Journal of Epidemiology*. 2001 Aug 15; 154 (4): 328 – 335. PMID: 11495856.

Bossa F, Latiano A, Rossi L, Magnani M, Palmieri O, Dallapiccola B, Serafini S, Damonte G et al. (2008) Erythrocyte-mediated delivery of dexamethasone in patients with mild-to-moderate ulcerative colitis, refractory to mesalamine: a randomized, controlled study. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Oct; 103 (10): 2509 – 2516. PMID: 18721243.

Bourguet W, Germain P, Gronemeyer H (2000) Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2000 Oct; 21 (10): 381 – 388. PMID: 11050318.

Bovee D, Zhou Y, Haugen E, Wu Z, Hayden HS, Gillett W, Tuzun E, Cooper GM et al. (2008) Closing gaps in the human genome with fosmid resources generated from multiple individuals. *Nature genetics*. 2008 Jan; 40 (1): 96 – 101. PMID: 18157130.

Bruch HP, Schwandner O, Farke S, Nolde J (2003) Pouch reconstruction in the pelvis. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*. 2003 Mar; 388 (1): 60 – 75. PMID: 12690483.

Brynskov J, Hansen MB, Reimert C, Bendtzen K (1991) Inhibitor of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta-induced T-cell activation in serum of patients with active Crohn's disease. *Digestive diseases and sciences*. 1991 Jun; 36 (6): 737 – 742. PMID: 2032514.

Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS, Thayer WR Jr, Coutu JA (1984) Characteristics of an unclassified Mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Journal of clinical microbiology*. 1984 Nov; 20 (5): 966 – 971. PMID: 6511878.

Cho J (2006) Genetic advances in inflammatory bowel disease. *Current Treatment Options in Gastroenterology*. 2006 Jun; 9 (3): 191 – 200. PMID: 16901383.

Cho JH (2008) The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature reviews immunology*. 2008 Jun; 8 (6): 458 – 466. PMID: 18500230.

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L et al. (1998) Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998 Jun 23; 95 (13): 7502 – 7507. PMID: 9636179.

Cipolla C, Magliocco A, Oliva L, Cottone M (1996) Familial aggregation of inflammatory bowel disease in a Mediterranean area. *European Journal of Epidemiology*. 1996 Apr; 12 (2): 205 – 210. PMID: 8817201.

Cornish JA, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP (2008) The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Sep; 103 (9): 2394 – 2400. PMID: 18684177.

Cosnes J (2008) What is the link between the use of tobacco and IBD? Inflammatory bowel diseases. 2008 Oct; 14 (S2): S14 – S15.

Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP (2002) Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut*. 2002 Dec; 51 (6): 803 – 807. PMID: 12427780.

Dajotoy T, Andersson P, Bjartell A, Löfdahl CG, Tapper H, Egesten A (2004) Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN-gamma. *Journal of leukocyte biology*. 2004 Sep; 76 (3): 685 – 691. PMID: 15197236.

de Mesquita MB, Civitelli F, Levine A (2008) Epidemiology, genes and inflammatory bowel diseases in childhood. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2008 Jan; 40 (1): 3 – 11. PMID: 17997369.

de Ridder L, Weersma RK, Dijkstra G, van der Steege G, Benninga MA, Nolte IM, Taminiyasu JA, Hommes DW et al. (2007) Genetic susceptibility has a more important role in pediatric-onset Crohn's disease than in adult-onset Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Sep; 13 (9): 1083 – 92. PMID: 17476680.

Diefenbach KA & Breuer CK (2006) Pediatric inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2006 May 28; 12 (20): 3204 – 3212. PMID: 16718840.

Dring MM, Goulding CA, Trimble VI, Keegan D, Ryan AW, Brophy KM, Smyth CM, Keeling PWN et al. (2006) The pregnane x receptor locus is associated with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2006; 130: 341 – 348. PMID: 16472590.

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C et al. (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006 Dec 1; 314 (5804): 1461 – 1463. PMID: 17068223.

Dwinell MB, Lügering N, Eckmann L, Kagnoff MF (2001) Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*. 2001 Jan; 120 (1): 49 – 59. PMID: 11208713.

Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA et al. (1996) Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *Journal of immunology*. 1996 Sep 1; 157 (5): 2174 – 2185. PMID: 8757344.

Ephgrave K (2007) Extra-intestinal manifestations of Crohn's disease. *Surgical Clinics of North America*. 2007 Jun; 87 (3): 673 – 680. PMID: 17560419.

Fazio VW, Marchetti F, Church M, Goldblum JR, Lavery C, Hull TL, Milsom JW, Strong SA et al. (1996) Effect of resection margins on the recurrence of Crohn's disease in the small bowel. A randomized controlled trial. *Annals of surgery*. 1996 Oct; 224 (4): 563 – 571; PMID: 8857860.

Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, Pfyffer GE, Jemmi T et al. (2007) Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*. 2007 Sep; 7 (9): 607 – 613. PMID: 17714674.

Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, Geary RB, Barclay ML, Demmers P, McCulloch A, Han DY (2008) Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. *World journal of gastroenterology*. 2008 Aug 7; 14 (29): 4652 – 4661. PMID: 18698679.

Frisch M, Johansen C, Mellekjaer L, Engels EA, Gridley G, Biggar RJ, Olsen JH (2001) Appendectomy and subsequent risk of inflammatory bowel diseases. *Surgery*. 2001 Jul; 130 (1): 36 – 43. PMID: 11436010.

Frisch M, Pedersen BV, Andersson RE (2009) Appendicitis, mesenteric lymphadenitis, and subsequent risk of ulcerative colitis: cohort studies in Sweden and Denmark. *British medical journal*. 2009 Mar 9; 338: b716. PMID: 19273506.

Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D et al. (2000) A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory bowel diseases*. 2000 Feb; 6 (1): 8 – 15. PMID: 10701144

Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J (2006) New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *The Lancet*. 2006 Apr 15; 367 (9518): 1271 – 1284. PMID: 16631883.

Geary RB, Richardson A, Frampton CM, Collett JA, Burt MJ, Chapman BA, Barclay ML (2006) High incidence of Crohn's disease in Canterbury, New Zealand: results of an epidemiologic study. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Oct; 12 (10): 936 – 943. PMID: 17012964.

Gheorghe C, Pascu O, Gheorghe L, Iacob R, Dumitru E, Tantau M, Vadan R, Goldis A et al. (2004) Epidemiology of inflammatory bowel disease in adults who refer to gastroenterology care in Romania: a multicentre study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2004 Nov; 16 (11): 1153 – 1159. PMID: 15489575.

Goldstein N & Dulai M (2006) Contemporary morphologic definition of backwash ileitis in ulcerative colitis and features that distinguish it from Crohn Disease. *American Journal of Clinical Pathology*. 2006; 126: 365 – 376. PMID: 16880149.

Goodwin B, Redinbo MR, Kliewer SA (2002) Regulation of CYP3A gene transcription by the pregnane X receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2002; 42: 1 – 23. PMID: 11807162.

Gupta SK, Fitzgerald JF, Chong SK, Croffie JM, Garcia JG (1998) Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in inflamed esophageal and colonic mucosa in a pediatric population. *The American journal of gastroenterology*. 1998 May; 93 (5): 795 – 798. PMID: 9625130.

Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2006 Jun 21; 12 (23): 3668 – 3672. PMID: 16773682.

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G et al. (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature genetics*. 2007 Feb; 39 (2): 207 – 211. PMID: 17200669.

Herrinton LJ, Liu L, Lewis JD, Griffin PM, Allison J (2008) Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a Northern California managed care organization, 1996 – 2002. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Aug; 103 (8): 1998 – 2006. PMID: 18796097.

Hildebrand H, Finkel Y, Grahnquist L, Lindholm J, Ekbohm A, Askling J (2003) Changing pattern of paediatric inflammatory bowel disease in northern Stockholm 1990 – 2001. *Gut*. 2003 Oct; 52 (10): 1432 – 1434. PMID: 12970135.

Ho GT, Soranzo N, Tate SK, Drummond H, Nimmo ER, Tenesa A, Arnott ID, Satsangi J (2006) Lack of association of the pregnane X receptor (PXR/NR112) gene with inflammatory bowel disease: parallel allelic association study and gene wide haplotype analysis. *Gut*. 2006; 55: 1676 – 1677. PMID: 17047126.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31; 411 (6837): 599 – 603. PMID: 11385576.

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL et al. (1996) Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*. 1996 Feb 29; 379 (6568): 821 – 823. PMID: 8587604.

IBD Working Group of the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (2005) Inflammatory bowel disease in children and adolescents: recommendations for diagnosis – the Porto criteria. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2005 Jul; 41 (1): 1 – 7. PMID: 15990620.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21; 431 (7011): 931 – 945. PMID: 15496913.

Irving PM & Gibson PR (2008) Infections and IBD. *Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology*. 2008 Jan; 5 (1): 18 – 27. PMID: 18174904.

Ito R, Shin-Ya M, Kishida T, Urano A, Takada R, Sakagami J, Imanishi J, Kita M et al. (2006) Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. *Clinical and experimental immunology*. 2006 Nov; 146 (2): 330 – 338. PMID: 17034586.

Johnson AD, Wang D, Sadee W (2005) Polymorphisms affecting gene regulation and mRNA processing: broad implications for pharmacogenetics. *Pharmacology & Therapeutics*. 2005; 106: 19 – 38. PMID: 15781120.

Jones JL & Foxx-Orenstein AE (2007) The role of probiotics in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences*. 2007 Mar; 52 (3): 607 – 611. PMID: 17235706.

Kaplan GG, Pedersen BV, Andersson RE, Sands BE, Korzenik J, Frisch M (2007) The risk of developing Crohn's disease after an appendectomy: a population-based cohort study in Sweden and Denmark. *Gut*. 2007 Oct; 56 (10): 1387 – 1392. PMID: 17494106.

Kappelman MD & Bousvaros A (2008) Nutritional concerns in pediatric inflammatory bowel disease patients. *Molecular nutrition & food research*. 2008 Aug; 52 (8): 867 – 874. PMID: 18324705.

Kim SC & Ferry GD (2004) Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology*. 2004 May; 126 (6): 1550 – 1560. PMID: 15168366.

King CR, Xiao M, Yu J, Minton MR, Addleman NJ, Van Booven DJ, Kwok P-Y, McLeod HL et al. (2007) Identification of NR112 genetic variation using re-sequencing. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2007; 63: 547 – 554. PMID: 17404718.

Klement E, Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S (2004) Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Nov; 80 (5): 1342 – 1352. PMID: 15531685.

Kliwer SA, Moore JT, Wade L, Staudinger JL, Watson MA, Jones SA, McKee DD, Oliver BB et al. (1998) An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*. 1998 Jan; 92 (1): 73 – 82. PMID: 9489701.

Kolek A, Janout V, Tichy M, Grepl M (2004) The incidence of inflammatory bowel disease is increasing among children 15 years old and younger in the Czech Republic. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2004 Mar; 38 (3): 362 – 363. PMID: 15076645.

Koletzko S & Siegert T (2004) Ernährungstherapie der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen. *Monatsschrift Kinderheilkunde*. 2004; 152: 145 – 152.

Kolios G, Valatas V, Ward SG (2004) Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. *Immunology*. 2004 Dec; 113 (4): 427 – 437. PMID: 15554920.

Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G (2008) Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature. *World journal of gastroenterology*. 2008 Jan 14; 14 (2): 165 – 173. PMID: 18186549.

Kristensen NN, Brudzewsky D, Gad M, Claesson MH (2006) Chemokines involved in protection from colitis by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Jul; 12 (7): 612 – 618. PMID: 16804399.

Kumar R & Thompson EB (1999) The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 1999 May; 64 (5): 310 – 319. PMID: 10406480.

Lakatos L, Mester G, Erdélyi Z, Balogh M, Szipócs I, Kamarás G, Lakatos PL (2003) Epidemiology of inflammatory bowel diseases in Veszprém county of Western Hungary between 1977 and 2001. *Orvosi hetilap*. 2003 Sep 14; 144 (37): 1819 – 1827. PMID: 14596020.

Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE (2002) Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002; 54: 1271 – 1294. PMID: 12406645.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15; 409 (6822): 860 – 921. PMID: 11237011.

Langmann T, Moehle C, Mauerer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, Stremmel W, Schmitz G (2004) Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology*. 2004; 127: 26 – 40. PMID: 15236169.

Lesage S, Zouali H, Cézard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C et al. (2002) CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *American journal of human genetics*. 2002 Apr; 70 (4): 845 – 857. PMID: 11875755.

Linares de la Cal JA, Cantón C, Hermida C, Pérez-Miranda M, Maté-Jiménez J (1999) Estimated incidence of inflammatory bowel disease in Argentina and Panama (1987 – 1993). *Revista española de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva*. 1999 Apr; 91 (4): 277 – 286. PMID: 10348927.

Lindberg E & Järnerot G (1991) The incidence of Crohn's disease is not decreasing in Sweden. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 1991 May; 26 (5): 495 – 500. PMID: 1871542.

Loetscher P, Pellegrino A, Gong J-H, Mattioli I, Loetscher M, Bardi G, Bagglioni M, Clark-Lewis I (2001) The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001 Feb 2; 276 (5): 2986 – 2991. PMID: 11110785.

Loftus CG, Loftus EV Jr, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ 3rd, Sandborn WJ (2007) Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940 – 2000. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Mar; 13 (3): 254 – 261. PMID: 17206702.

Loftus EV Jr, Schoenfeld P, Sandborn WJ (2002) The epidemiology and natural history of Crohn's disease in population-based patient cohorts from North America: a systematic review. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2002 Jan; 16 (1): 51 – 60. PMID: 11856078.

Loftus EV Jr. (2004) Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*. 2004; 126: 1504 – 1517. PMID: 15168363.

Lok KH, Hung HG, Ng CH, Li KK, Li KF, Szeto ML (2007) The epidemiology and clinical characteristics of Crohn's disease in the Hong Kong Chinese population: experiences from a regional hospital. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi / Hong Kong Academy of Medicine*. 2007 Dec; 13 (6): 436 – 441. PMID: 18057431.

Looijer-van Langen MA & Dieleman LA (2008) Prebiotics in chronic intestinal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Mar; 15 (3): 454 – 462. PMID: 18831524

Lowe AM, Roy PO, B-Poulin M, Michel P, Bitton A, St-Onge L, Brassard P (2008) Epidemiology of Crohn's disease in Québec, Canada. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Mar; 15 (3): 429 – 435. PMID: 18942744.

Ludwiczek O, Vannier E, Borggraefe I, Kaser A, Siegmund B, Dinarello CA, Tilg H (2004) Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology*. 2004 Nov; 138 (2): 323 – 329. PMID: 15498044.

Maartense S, Dunker MS, Slors JF, Cuesta MA, Pierik EG, Gouma DJ, Hommes DW, Sprangers MA et al. (2006) Laparoscopic-assisted versus open ileocolic resection for Crohn's disease: a randomized trial. *Annals of surgery*. 2006 Feb; 243 (2): 143 – 149. PMID: 16432345.

Martín MC, Martínez A, Mendoza JL, Taxonera C, Díaz-Rubio M, Fernández-Arquero M, de la Concha EG, Urcelay E (2007) Influence of the inducible nitric oxide synthase gene (NOS2A) on inflammatory bowel disease susceptibility. *Immunogenetics*. 2007 Nov; 59 (11): 833 – 837. PMID: 17955236.

Martínez A, Márquez A, Mendoza J, Taxonera C, Fernández-Arquero M, Díaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E (2007) Role of the PXR gene locus in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*. 2007 Dec; 13 (12): 1484 – 1487. PMID: 17828778.

Matsuda R, Koide T, Tokoro C, Yamamoto T, Godai T, Morohashi T, Fujita Y, Takahashi D et al. (2008) Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Mar; 15 (3): 328 – 334. PMID: 18942752.

Mitsuyama K, Suzuki A, Tomiyasu N, Takaki K, Toyonaga A, Sata M (2001) Transcription factor-targeted therapies in inflammatory bowel disease. *Digestion*. 2001; 63 Suppl 1: 68 – 72. PMID: 11173913.

Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, Gazave E, de Cid R, Milne R, Amigo J, Ferrer-Admetlla A et al. (2008) SNP Analysis To Results (SNPator): a web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics*. 2008 Jul 15; 24 (14): 1643 –1644. PMID: 18515823.

Morita N, Toki S, Hirohashi T, Minoda T, Ogawa K, Kono S, Tamakoshi A, Ohno Y et al. (1995) Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Japan: nationwide epidemiological survey during the year 1991. *Journal of Gastroenterology*. 1995 Nov; 30 Suppl 8: 1 – 4. PMID: 8563866.

Murata Y, Yamashita A, Saito T, Sugamura K, Hamuro J (2002) The conversion of redox status of peritoneal macrophages during pathological progression of spontaneous inflammatory bowel disease in Janus family tyrosine kinase 3^(-/-) and IL-2 receptor gamma^(-/-) mice. *International immunology*. 2002 Jun; 14 (6): 627 – 636. PMID: 12039914.

Murdoch C & Finn A (2000) Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000 May 15; 95 (10): 3032 – 3043. PMID: 10807766.

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O et al. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*. 1996, Feb; 6 (1): 1 – 42. PMID: 8845856.

Nicholas DB, Otley A, Smith C, Avolio J, Munk M, Griffiths AM (2007) Challenges and strategies of children and adolescents with inflammatory bowel disease: a qualitative examination. *Health and Quality of Life Outcomes*. 2007 May 25; 5: 28. PMID: 17531097.

Nieuwenhuis EE & Escher JC (2008) Early onset IBD: what's the difference? *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2008 Jan; 40 (1): 12 – 15. PMID: 17997370.

Nikolaus S & Schreiber S (2008) Anti-TNF biologics in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Der Internist*. 2008 Aug; 49 (8): 947 – 954. PMID: 18584139.

Oliver J, Gómez-García M, Vilchez JR, López-Nevot MA, Piñero A, Correro F, Nieto A, Martín J (2006) Inducible and endothelial nitric oxide synthase genes polymorphism in inflammatory bowel disease. *Tissue antigens*. 2006 Apr; 67 (4): 326 – 330. PMID: 16634870.

OMIM (2008) Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM™. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), Stand: 31.12.2008 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)

Oostenbrug LE, Nolte IM, Oosterom E, van der Steege G, te Meerman GJ, van Dullemen HM, Drenth JP, de Jong DJ et al. (2006) CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: an association study and pooled analysis. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2006 Nov; 38 (11): 834 – 845. PMID: 16920047.

Ott C, Obermeier F, Thieler S, Kemptner D, Bauer A, Schölmerich J, Rogler G, Timmer A (2008) The incidence of inflammatory bowel disease in a rural region of Southern Germany: a prospective population-based study. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2008 Sep; 20 (9): 917 – 923. PMID: 18794607.

Papadakis KA & Targan SR (2000) The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation. *Inflammatory bowel diseases*. 2000 Nov; 6 (4): 303 – 313. PMID: 11149563.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C et al. (1997) Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *The American journal of pathology*. 1997 Mar; 150 (3): 823 – 832. PMID: 9060820.

Patel HI, Leichtner AM, Colodny AH, Shamberger RC (1997) Surgery for Crohn's disease in infants and children. *Journal of pediatric surgery*. 1997 Jul; 32 (7): 1063 – 1067. PMID: 9247235.

Perminow G, Frigessi A, Rydning A, Nakstad B, Vatn MH (2006) Incidence and clinical presentation of IBD in children: comparison between prospective and retrospective data in a selected Norwegian population. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2006 Dec; 41 (12): 1433 – 1439. PMID: 17101574.

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 2001 May 1; 29 (9): e45. PMID: 11328886.

Pinsk V, Lemberg DA, Grewal K, Barker CC, Schreiber RA, Jacobson K (2007) Inflammatory Bowel Disease in the South Asian Pediatric Population of British Columbia. *The American journal of gastroenterology*. 2007 May; 102 (5): 1077 – 1083. PMID: 17378907.

Polle SW, Slors JF, Weverling GJ, Gouma DJ, Hommes DW, Bemelman WA (2005) Recurrence after segmental resection for colonic Crohn's disease. *The British journal of surgery*. 2005 Sep; 92 (9): 1143 – 1149. PMID: 16035133.

Pschyrembel (2004) *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch*. 260. Auflage. Walter de Gruyter Berlin – New York. 2004: 1457 Stichwort: Polymorphismus.

Radon K, Windstetter D, Poluda AL, Mueller B, von Mutius E, Koletzko S; Chronische Autoimmunerkrankungen und Kontakt zu Tieren (Chronic Autoimmune Disease and Animal Contact) Study Group (2007) Contact with farm animals in early life and juvenile inflammatory bowel disease: a case-control study. *Pediatrics*. 2007 Aug; 120 (2): 354 – 361. PMID: 17671062.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, Green T, Kuballa P et al. (2007) Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn's disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nature genetics*. 2007 May; 39 (5): 596 – 604. PMID: 17435756.

Roediger WE & Babidge W (1997) Human colonocyte detoxification. *Gut*. 1997 Dec; 41 (6): 731 – 734. PMID: 9462203.

Roses RE & Rombeau JL (2008) Recent trends in the surgical management of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008 Jan 21; 14 (3): 408 – 412. PMID: 18200663.

Rossi D & Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology*. 2000; 18: 217 – 242. PMID: 10837058.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20; 230 (4732): 1350 – 1354. PMID: 2999980.

Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK (2008) Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008 Jul 21; 14 (27): 4280 – 4288. PMID: 18666314.

Sands BE (2004) From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2004 May; 126 (6): 1518 – 1532. PMID: 15168364.

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF (2006) The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut*. 2006 Jun; 55 (6): 749 – 753. PMID: 16698746

Scheerens H, Hessel E, de Waal-Malefyt R, Leach MW, Rennick D (2001) Characterization of chemokines and chemokine receptors in two murine models of inflammatory bowel disease: IL-10^{-/-} mice and Rag-2^{-/-} mice reconstituted with CD4⁺CD45RB^{high} T cells. *European Journal of Immunology*. 2001; 31: 1465 – 1474. PMID: 11465103.

Schreiber S, Rosenstiel P, Hampe J, Nikolaus S, Groessner B, Schottelius A, Kühbacher T, Hämling J et al. (2002) Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut*. 2002 Sep; 51 (3): 379 – 385. PMID: 12171960.

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M (1996) Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut*. 1996 Nov; 39 (5): 690 – 697. PMID: 9014768.

Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF et al. (2005) Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2005 Sep; 19 Suppl A: 5 – 36. PMID: 16151544.

Simpson CR, Anderson WJ, Helms PJ, Taylor MW, Watson L, Prescott GJ, Godden DJ, Barker RN (2002) Coincidence of immune-mediated diseases driven by Th1 and Th2 subsets suggests a common aetiology. A population-based study using computerized general practice data. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2002 Jan; 32 (1): 37 – 42. PMID: 12002734.

Singh UP, Venkataraman C, Singh R, Lillard JW Jr (2007) CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorder – Drug Targets*. 2007 Jun; 7 (2): 111 – 123. PMID: 17584151.

Sonnenberg A (2008) Date of birth in the occurrence of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 2009 Feb; 15 (2): 206 – 211. PMID: 18831526.

Sood A, Midha V, Sood N, Bhatia AS, Avasthi G (2003) Incidence and prevalence of ulcerative colitis in Punjab, North India. *Gut*. 2003 Nov; 52 (11): 1587 – 1590. PMID: 14570727.

Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, Lepage P, Raedler A, Schreiber S (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflammatory bowel diseases*. 2008 Jul; 14 (7): 968 – 976. PMID: 18253950.

Stähler P, Beier M, Gaob X, Hoheisel JD (2006) Another side of genomics: Synthetic biology as a means for the exploitation of whole-genome sequence information. *Journal of Biotechnology*. 2006; 124: 206 – 212. PMID: 16436303.

Stewénus J, Adnerhill I, Ekelund G, Florén CH, Fork FT, Janzon L, Lindström C, Mars I et al. (1995) Ulcerative colitis and indeterminate colitis in the city of Malmö, Sweden. A 25-year incidence study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1995 Jan; 30 (1): 38 – 43. PMID: 7701248.

Strong SA (2002) Surgical treatment of inflammatory bowel disease. *Current opinion in gastroenterology*. 2002 Jul; 18 (4): 441 – 446. PMID: 17033319.

Summers RW (2007) Novel and future medical management of inflammatory bowel disease. *Surgical Clinics of North America*. 2007 Jun; 87 (3): 727 – 741. PMID: 17560422.

Syvänen AC (2001) Accessing genetic variation: Genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature genetics*. 2001 Dec; 2: 930 – 942. PMID: 11733746.

Tamboli CP (2007) Current medical therapy for chronic inflammatory bowel diseases. *Surgical Clinics of North America*. 2007 Jun; 87 (3): 697 – 725. PMID: 17560421.

Thoreson R & Cullen JJ (2007) Pathophysiology of inflammatory bowel disease: an overview. *Surgical Clinics of North America*. 2007 Jun; 87 (3): 575 – 585. PMID: 17560413.

Timmer A & Goebell H (1999) Incidence of ulcerative colitis, 1980 – 1995 - a prospective study in an urban population in Germany. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 1999 Nov; 37 (11): 1079 – 1084. PMID: 10604221.

Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H (1999) Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980 – 1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflammatory bowel diseases*. 1999 May; 5 (2): 79 – 84. PMID: 10338375.

Torres MI & Rios A (2008) Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy. *World journal of gastroenterology*. 2008 Apr 7; 14 (13): 1972 – 1980. PMID: 18395894.

Townson DH & Liptak AR (2003) Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003 Nov 10; 1: 94. PMID: 14613530.

Tremelling M, Waller S, Bredin F, Greenfield S, Parkes M (2006) Genetic variants in TNF-alpha but not DLG5 are associated with inflammatory bowel disease in a large United Kingdom cohort. *Inflammatory bowel diseases*. 2006 Mar; 12 (3): 178 – 184. PMID: 16534418.

Valenta R, Mittermann I, Werfel T, Garn H, Renz H (2009) Linking allergy to autoimmune disease. 2009 Mar; 30 (3): 109 – 116. PMID: 19231288.

van Heel DA, Dechairo BM, Dawson G, McGovern DP, Negoro K, Carey AH, Cardon LR, Mackay I et al. (2003) The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants. *Human molecular genetics*. 2003 Oct 15; 12 (20): 2569 – 2575. PMID: 12928481.

van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM; Genome Scan Meta-Analysis Group of the IBD International Genetics Consortium (2004) Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human molecular genetics*. 2004 Apr 1; 13 (7): 763 – 770. PMID: 14976156.

Viola A & Luster AD (2008) Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008; 48: 171 – 197. PMID: 17883327.

Walker JR, Ediger JP, Graff LA, Greenfeld JM, Clara I, Lix L, Rawsthorne P, Miller N et al. (2008) The Manitoba IBD cohort study: a population-based study of the prevalence of lifetime and 12-month anxiety and mood disorders. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Aug; 103 (8): 1989 – 1997. PMID: 18796096.

Walters TD & Silverberg MS (2006) Genetics of inflammatory bowel disease: current status and future directions. *Canadian Journal of Gastroenterology*. 2006; 20 (10): 633 – 639. PMID: 17066152.

Wärnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA (2003) Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Journal of molecular endocrinology*. 2003 Oct; 17 (10): 1901 – 1909. PMID: 12893880.

Weersma RK, van Dullemen HM, van der Steege G, Nolte IM, Kleibeuker JH, Dijkstra G (2007) Review article: Inflammatory bowel disease and genetics. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2007 Dec; 26 Suppl 2: 57 – 65. PMID: 18081650.

Weidinger S, Klopp N, Rümmler L, Wagenpfeil S, Baurecht HJ, Gauger A, Darsow U, Jakob T et al. (2005) Association of CARD15 polymorphisms with atopy-related traits in a population-based cohort of Caucasian adults. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 2005 Jul; 35 (7): 866 – 872. PMID: 16008671.

Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007 Jun 7; 447 (7145): 661 – 678. PMID: 17554300.

Wright JP, Froggatt J, O'Keefe EA, Ackerman S, Watermeyer S, Louw J, Adams G, Girdwood AH et al. (1986) The epidemiology of inflammatory bowel disease in Cape Town 1980 – 1984. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde*. 1986 Jul 5; 70 (1): 10 – 15. PMID: 3726680.

www.mygeo.info (2008) Weltkarte (politisch), Projektion: Robinson, Zentral Meridian: 0°, Stand: 06.08.2008, Bestandteil des www.mygeo.info-Projekts (<http://www.mygeo.info/weltkarten.html>); lizenziert unter der Creative Commons Attribution 3.0, Stand: 04.11.2008 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.de>).

Xu H, Gregory SG, Hauser ER, Stenger JE, Pericak-Vance MA, Vance JM, Züchner S, Hauser MA (2005) SNPselector: a web tool for selecting SNPs for genetic association studies. *Bioinformatics*. 2005; 21 (22): 4181 – 4186. PMID: 16179360.

Yang SK, Hong WS, Min YI, Kim HY, Yoo JY, Rhee PL, Rhee JC, Chang DK et al. (2000) Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong District, Seoul, Korea, 1986-1997. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2000 Sep; 15 (9): 1037 – 1042. PMID: 11059934.

Yao T, Matsui T, Hiwatashi N (2000) Crohn's disease in Japan: diagnostic criteria and epidemiology. *Diseases of the colon and rectum*. 2000 Oct; 43 (10 Suppl): S 85 – 93. PMID: 11052483.

Yazdanbakhsh M, Kreamsner PG, van Ree R (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*. 2002 Apr 19; 296 (5567): 490 – 494. PMID: 11964470.

Zhang J, Kuehl P, Green ED, Touchman JW, Watkins PB, Daly A, Hall SD, Maurel P et al. (2001) The human pregnancy X receptor: genomic structure and identification and functional characterization of natural allelic variants. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 555 – 572. PMID: 11668216.

Zhang J, Noguchi E, Migita O, Yokouchi Y, Nakayama J, Shibasaki M, Arinami T (2005) Association of a haplotype block spanning SDAD1 gene and CXC chemokine genes with allergic rhinitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2005 Mar; 115 (3): 548 – 554. PMID: 15753903.

Zheng W, Rosenstiel P, Huse K, Sina C, Valentonyte R, Mah N, Zeitlmann L, Grosse J et al. (2006) Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes and immunity*. 2006 Jan; 7 (1): 11 – 18. PMID: 16222343.

Zisman TL & Rubin DT (2008) Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology*. 2008 May 7; 14 (17): 2662 – 2669. PMID: 18461651.

Zlotnik A & Yoshie O (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb; 12 (2): 121 – 127. PMID: 10714678.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Roland Kappler für meine Aufnahme in sein Forschungslabor mit der Möglichkeit zur Promotion, für seine exzellente wissenschaftliche Betreuung und geduldige Hilfestellung sowie für die vielfältigen Anregungen und Diskussionen.

Mein herzlicher Dank gilt weiterhin meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Dr. med. Martin Lacher für die Überlassung des interessanten Themas und die Schaffung aller Voraussetzungen dieser Arbeit, für die intensive Unterstützung und Betreuung sowie für sein Vertrauen, das er mir stets entgegengebracht hat.

Ein großer Dank gebührt Frau Fatemeh Promoli für ihre hervorragende Anleitung und große Hilfe während meiner Arbeit im Labor.

Namentlich Herrn Prof. Dr. med. Dietrich von Schweinitz und Frau Prof. Dr. med. Sibylle Koletzko sowie allen Mitarbeitern des Dr. von Haunerschen Kinderspitals und des Forschungszentrums KUBUS sowie meinen Kollegen der Kinderchirurgischen Forschungslaboratorien, die alle zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls ganz herzlich für die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung danken.

Schließlich danke ich allen Kindern, ihren Eltern und den erwachsenen Patienten, die sich für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben.