

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Innenstadt
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Untersuchung von Polymorphismen im Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9)-Gen
bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Ilona Marie Charlotte Endres

aus

Kaufbeuren

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Folwaczny

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dr. Carole Bourquin
Priv. Doz. Dr. Christian Ries

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Helga-Paula Török

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2010

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

H.-P. Török, J. Glas, I. Endres, L. Tonenchi, M. Y. Teshome, M. Wetzke, W. Klein, P. Lohse, T. Ochsenkühn, M. Folwaczny, B. Göke, C. Folwaczny, B. Müller-Myhsok, S. Brand: Epistasis between Toll-like receptor (*TLR*)-9 polymorphisms and variants in *NOD2* and *IL23R* modulates susceptibility to Crohn's disease. *American Journal of Gastroenterology* 2009; 104 (7): 1723-1733

1.	Einleitung	7
1.1	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)	7
1.1.1	Morbus Crohn	7
1.1.2	Colitis ulcerosa	9
1.2	Epidemiologie	12
1.3	Ätiologie	14
1.3.1	Umweltfaktoren.....	14
1.3.2	Genetische Faktoren	18
1.3.3	Das mukosale Immunsystem.....	20
1.4	Genetische Untersuchungen und mögliche krankheitsrelevante Gene	24
1.4.1	Genetische Kopplungsanalysen.....	24
1.4.2	Genetische Assoziationsstudien	26
1.4.3	Kopplungsregionen und Kandidatengene vor der Ära genomweiter Assoziationsstudien	26
1.4.4	Die Erkenntnisse aus den neuen genomweiten Assoziationsstudien	34
1.5	Das Immunsystem	35
1.5.1	Pattern Recognition Receptors (PRRs)	36
1.5.2	Die Toll-like Rezeptoren (TLR).....	37
1.5.3	TLR 9	42
1.6	Zielsetzung der Arbeit	44
2.	Material und Methoden	46
2.1	Studienpopulation	46
2.1.1	Studienpopulation für die Polymorphismenanalyse.....	46
2.1.2	Studienpopulation für die Expressionsanalyse.....	47
2.2	Phänotypische Daten der CED-Patienten	49
2.3	DNA-Isolierung aus Blutleukozyten und aus Darmbiopsien	50
2.3.1	Material	50
2.3.2	Methode.....	51
2.4	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren	53
2.4.1	Material	53
2.4.2	Methode.....	54
2.5	Die PCR (polymerase chain reaction)	54
2.5.1	Material	54
2.5.2	Methode.....	55
2.6	Restriktionsverdau	58
2.6.1	Material	58
2.6.2	Methode.....	59

2.7	Agarosegelelektrophorese.....	59
2.7.1	Material	59
2.7.2	Methode.....	60
2.8	Genotypisierung mittels Hybridisierungssondenmethode	61
2.8.1	Material	61
2.8.2	Methode.....	62
2.9	RNA-Isolierung aus Darmbiopsien.....	65
2.9.1	Material	65
2.9.2	Methode.....	66
2.10	RT-PCR (cDNA-Synthese)	67
2.10.1	Material	67
2.10.2	Methode.....	67
2.11	Die quantitative PCR	69
2.11.1	Material	69
2.11.2	Methode.....	70
2.12	Sonstige Geräte	73
2.13	Statistische Auswertung.....	73
2.13.1	Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test).....	74
2.13.2	Fisher-Exakt-Test	75
2.13.3	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	75
2.13.4	Korrektur nach Bonferroni	77
2.13.5	Mann-Whitney U-Test	77
2.13.6	Wilcoxon-Test.....	78
3.	Ergebnisse	79
3.1	Polymorphismen im TLR9-Gen.....	79
3.1.1	Der -T1237C-Polymorphismus im TLR9-Gen.....	79
3.1.2	Der A2848G-Polymorphismus im TLR9-Gen.....	81
3.2	Mutationen im NOD2-Gen	83
3.3	Interaktionen zwischen den TLR9-Polymorphismen und NOD2-Mutationen bei Morbus Crohn – Patienten	84
3.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.....	88
3.5	TLR9-mRNA-Expression in der Darmmukosa.....	91
3.5.1	TLR9-mRNA-Expression in verschiedenen Darmabschnitten	91
3.5.2	TLR9-mRNA-Expression bei MC und CU-Personen im Vergleich zur Kontrollpopulation	92
3.5.3	Einfluss einer aktiven Entzündung auf die TLR9-mRNA-Expression bei MC und CU	94
3.5.4	Einfluss des Genotyps und klinischen Phänotyps auf die TLR9-mRNA-Expression	94

4. Diskussion	96
4.1 Studiendesign und Methoden	96
4.1.1 Assoziationsstudien	96
4.1.2 Auswahl und Validität der Methoden	98
4.2 Bedeutung der Ergebnisse aus genetischer Sicht	99
4.2.1 Frequenz der Polymorphismen und Vergleich zu anderen Daten aus der Literatur	99
4.2.2 Frequenz der Polymorphismen bei CED-Patienten	101
4.2.3 Interaktionen mit NOD2-Mutationen bei Morbus Crohn-Patienten	102
4.3 Bedeutung der Ergebnisse aus funktioneller Sicht	103
5. Zusammenfassung.....	106
6. Literaturverzeichnis.....	108
7. Lebenslauf	148
8. Danksagung	149

1. Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Der Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen umfasst die zwei Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Charakteristisch für beide Krankheiten ist eine chronisch unkontrollierte Entzündung der intestinalen Mukosa, die jeden Abschnitt des Gastrointestinaltraktes betreffen kann, unterschiedlicher Ausprägung und Manifestation. Was chronisch entzündliche Darmerkrankungen von einer physiologischen Entzündungsreaktion eines „gesunden Darmes“ unterscheidet, ist die Unfähigkeit, die Immunantworten herunterzuregeln. Das mukosale Immunsystem bleibt chronisch aktiv und der Darm dadurch chronisch entzündet (Hanauer 2006).

Zur Diagnosestellung zählen die typischen klinischen, laborchemischen, endoskopischen, radiologischen und histologischen Befunde (Nayar 2004, Viscido 2005, Stange 2006). Trotzdem gelingt nicht immer eine eindeutige Zuordnung. Über 10% der Patienten haben unbestimmte Krankheitsbilder zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die nicht klar klassifiziert werden können und als „indeterminate colitis“ bezeichnet werden (Podolsky 2002). Die Therapieplanung wird je nach Art und Schwere der Krankheit ganz individuell gestaltet und erstreckt sich von Antibiotika über Immunsuppressiva bis hin zur operativen Versorgung (Viscido 2005). Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist bisher noch weitgehend unbekannt, scheint aber multifaktoriell zu sein. In der Ursachenforschung stehen genetische Faktoren, Umwelteinflüsse und eine immunologische Fehlregulation zur Diskussion (Timmer 2003).

1.1.1 Morbus Crohn

Morbus Crohn ist eine Entzündung, die den gesamten Gastrointestinaltrakt vom Mund bis zum Anus befallen kann, wobei das terminale Ileum und der proximale Kolonabschnitt am häufigsten betroffen sind. Ein isolierter Ileumbefall wird in 30 % der Fälle beobachtet, ein isolierter Kolonbefall in 25 % der Fälle und eine Kombination aus beidem in 45 % der Fälle (Harrison 2008). Eine internationale Einteilung ist durch die Vienna-Klassifikation von 1998 und die Montreal-Klassifikation von 2005 möglich. Beide basieren auf den Merkmalen Alter bei Diagnose, Lokalisation und Verlauf der Krankheit (Gaschè 2000, Satsangi 2006). Die

Entzündung verläuft schubweise, diskontinuierlich segmental und befällt alle Wandschichten des Darmes. Die Rezidivhäufigkeit innerhalb von einem Jahr beträgt 30 % und nach zwei Jahren 40 %.

	Vienna	Montreal
Alter bei Diagnose	A1 < 40 Jahre A2 > 40 Jahre	A1 ≤ 16 Jahre A2 zwischen 17 und 40 Jahre A3 > 40 Jahre
Lokalisation des MC	L1 Ileum L2 Kolon L3 Ileum und Kolon L4 oberer GI-Trakt	L1 Ileum L2 Kolon L3 Ileum und Kolon L4 isoliert oberer GI-Trakt*
Verlauf des MC	B1 keine Stenosen, keine Fisteln B2 Stenosen B3 Fisteln	B1 keine Stenosen, keine Fisteln B2 Stenosen B3 Fisteln p perianale Krankheit**

Tabelle 1.1 Klinische Subgruppen beim Morbus Crohn: die Vienna- und Montreal-Klassifikation
 * L4 kann mit L1-L3 kombiniert werden
 ** p wird zu B1-B3 hinzugefügt, wenn perianale Krankheit gleichzeitig auftritt

Die typischen Symptome sind Abdominalschmerzen, die häufig kolikartig im rechten Unterbauch lokalisiert sind, zusammen mit meist nicht blutigen Durchfällen. Ab einer Persistenz der Symptome von mehr als 6 Monaten spricht man von einem chronisch-aktiven Verlauf. Makroskopisch fällt eine ödematöse und fibrotische Verdickung der betroffenen Darmwand mit Ausbildung segmentaler Stenosen und Pflastersteinrelief auf. Histologisch überwiegt ein aus Makrophagen und Lymphozyten bestehendes entzündliches Infiltrat. Charakteristisch dafür sind zu 40 % Epitheloidzellgranulome und mehrkernige Riesenzellen. Häufig können eine Hyperplasie der zugehörigen Lymphknoten (makroskopisch gesehen sog. „Gänsehautaspekt“), Lymphangiectasien und aphthenähnliche Geschwüre der Schleimhaut mit Fissuren und Fistelbildung im weiteren Krankheitsverlauf nachgewiesen werden.

Die Komplikationsrate ist sehr hoch. Durch den fibrotischen Umbau der entzündeten Darmwand kommt es zur kontinuierlichen Einengung des Darmlumens bis hin zum Ileus. Außerdem treten in 40 % der Fälle Fisteln und in 25 % anorektale Abszesse auf. Auch extraintestinale Symptome wie Arthritis, Haut- und Augenbeteiligung kommen vor (Harrison 2008). Bei längerer Dauer der Erkrankung können Dünndarm- (Solomon 1998) und Kolonkarzinome auftreten (Ekbohm 1990a). Zusätzlich werden häufiger Lymphome beobachtet (Bernstein 2001).

Für die Behandlung des Morbus Crohn steht eine individuelle Therapieplanung im Vordergrund, wofür eine Anzahl von verschiedenen Medikamenten zur Verfügung steht. Der erste Schritt jeder Behandlung ist die Remissionsinduktion. Bei leichten bis mittelschweren Schüben werden dafür Antibiotika (z.B. Metronidazol), Aminosalicylate (z.B. Mesalazin, Sulfasalazin), lokale Kortikosteroide (z.B. Budenosid) oder bei deren Versagen systemische Kortikosteroide (z.B. Prednisolon) eingesetzt. Therapiestandard bei schweren akuten Schüben bilden immer systemische Kortikosteroide. Kann dadurch keine Remission erreicht werden, steigt man auf Immunsuppressiva wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin oder Immunmodulatoren wie TNF- α -Antikörper (Infliximab) um. Der zweite Schritt besteht in der Remissionserhaltung. Dafür sowie bei chronisch aktivem Verlauf kommen besonders Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Methotrexat zum Einsatz. Chirurgische Maßnahmen bleiben für Patienten mit Komplikationen (z.B. Ileus), Fisteln und therapierefraktären Verläufen vorbehalten (Cummings 2008, Hoffmann 2002, Nayar 2004, Isaacs 2005, Travis 2006, Williams 2009, Hanauer 2009, Colombel 2010).

1.1.2 Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa ist gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung der Dickdarmschleimhaut mit kontinuierlicher Ausbreitung und Ausbildung von Ulzerationen der oberflächlichen Schleimhautschichten.. Hierbei beginnt die Entzündung nahezu immer distal im Rektum und breitet sich variabel nach proximal im Kolon aus. Am häufigsten ist der isolierte Rektumsigmoidbefall mit 50 %. Zu 25 % kommt es zu einer Linksseitenkolitis mit Ausdehnung bis maximal zur linken Flexur und zu 25 % zu einer Pankolitis. In 10 bis 20 % der Fälle kommt es zur Mitbeteiligung des terminalen Ileums, was als Backwash-Ileitis bezeichnet wird (Heuschen 2001). Zu 85 % verläuft die Krankheit chronisch-rezidivierend mit Zeiten kompletter Remission. 10 % der Patienten machen einen chronisch-kontinuierlichen Krankheitsverlauf durch, wobei sich die Beschwerden in unterschiedlicher Intensität äußern. Ein akut fulminanter Verlauf kommt bei 5 % der Individuen vor (Harrison 2008, Herrlinger 2002). Eine internationale Einteilung ist durch die Montreal-Klassifikation von 2005 gegeben. Sie basiert auf den Merkmalen der Ausdehnung und dem Schweregrad der Krankheit (Satsangi 2006).

Ausdehnung der CU	
E1 ulcerative Proktitis	limitierter Befall des Rektums bis zum rektosigmoidalen Übergang
E2 distale CU (linksseitige CU)	Ausbreitung der Entzündung vom Rektum übergreifend auf das linke Kolon bis zur linken Kolonflexur
E3 Pankolitis	die Entzündung hat die linke Kolonflexur überschritten
Schweregrad der CU	
S0 klinische Remission	asymptomatisch
S1 milde CU	≥ 4x Stuhlgang/Tag (mit oder ohne Blut), keine weiteren systemischen Krankheitssymptome und normale Entzündungsparameter (BSG)
S2 mäßige CU	≥ 4x Stuhlgang/Tag mit minimalen Zeichen systemischer Beteiligung
S3 schwere CU	mindestens 6x blutiger Stuhlgang/Tag, HF >90/min, Temperatur >37,5°C, Hb <10,5g/100ml und BSG >30mm/h

Tabelle 1.2 Montreal-Klassifikation bei Colitis ulcerosa

Die Krankheit verläuft genauso wie Morbus Crohn schubweise mit Phasen totaler Remission. Leitsymptom sind blutig-schleimige Durchfälle mit Abdominalschmerzen z.T. krampfartig vor der Defäkation (Tenesmen). Makroskopisch zeigt sich im frischen Stadium eine entzündlich gerötete, ödematöse Schleimhaut, die bei Kontakt blutet, und kleine Schleimhautulzerationen mit Fibrinbelägen. Im chronisch-fortgeschrittenen Stadium führen die rezidivierenden Ulzerationen dann zur Schleimhautzerstörung mit Verlust des normalen Faltenreliefs. Histologisch typisch ist eine granulozytäre Infiltration der Schleimhaut mit Anhäufung von Granulozyten in den Krypten, was definitionsgemäß als Kryptenabszesse bezeichnet wird. Im weiteren Verlauf kommt es zur Schleimhautatrophie mit überwiegend lymphozytärer und histiozytärer Infiltration. Bei langdauerndem Krankheitsprozess entwickeln sich auch multilokulär Epitheldysplasien als Vorstufe zur karzinomatösen Entartung. Das Karzinomrisiko korreliert dabei mit dem Ausmaß der Kolonbeteiligung, der Dauer der Erkrankung, dem Alter bei Erstdiagnose und der familiären Vorbelastung (Itzkowitz 2005, Rhodes 2002, Solomon 1998). Das Auftreten weiterer Fälle eines kolorektalen Karzinoms in der Familie erhöht das Risiko um das Zweifache (Askling 2001a). Es wurde allerdings bisher die Hypothese nicht bestätigt, dass dieselben genetischen Faktoren in der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms und der Colitis ulcerosa eine Rolle spielen (Fonager 1998, Askling 2001b). Das relative Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln, erhöht sich bei der Pankolitis ab dem 10. Jahr und bei der linksseitigen Kolitis ab dem 15. Jahr nach Krankheitsbeginn um 0,5-1 % pro Jahr. Das kumulative Karzinomrisiko beträgt nach 20 Jahren im Durchschnitt 8 % und nach 30 Jahren 18 % (Eaden 2001, Harrison 2008, Solomon 1998). Zur Vorbeugung und Früherken-

nung einer malignen Entartung sind regelmäßige Kontrollkoloskopien mit Stufenbiopsien notwendig (Chambers 2005).

Bei der Colitis ulcerosa können sich auch Symptome an extraintestinalen Organen wie Gelenken (Arthritiden), Haut (Pyoderma gangraenosum), Augen (Iritis, Uveitis) und Leber (primär sklerosierende Cholangitis) manifestieren. Eine sehr gefürchtete Komplikation ist das toxische Megakolon mit septischen Temperaturen, Perforations- und Peritonitisgefahr, dessen Letalität bei 30 % liegt. Zur Abschätzung des Schweregrades des einzelnen Schubes sind Aktivitätsindizes etabliert worden, die sich aus klinischen und laborchemischen Parametern zusammensetzen.

Die Art der Therapie von Colitis ulcerosa hängt im Wesentlichen von der Schwere und Lokalisation der Krankheit ab. Bei milder bis mäßiger Entzündung sind Aminosalicylate Mittel der Wahl. Sie sind wirksam für Remissionsinduktion und –erhaltung. Zusätzlich werden zur Remissionsinduktion noch Kortikosteroide (lokal und systemisch) verabreicht. Der nächste therapeutische Schritt bei Versagen der Standardtherapie oder steroidabhängiger Colitis ulcerosa bildet die Immunsuppression mit Azathioprin und 6-Mercaptopurin. Wenn eine fortdauernde Steroidabhängigkeit besteht, wird eine remissionserhaltende Therapie mit Azathioprin eingeleitet. Bei schweren steroidrefraktären Verläufen wird Ciclosporin, Takrolimus oder TNF- α -Antikörper verabreicht. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Behandlung ist die Prävention der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. Laut Studien sind zur Karzinomprävention 5-Aminosalicylate gut. Diese können das Karzinomrisiko bis zu 75 % senken (Isaacs 2005, Farrell 2002). Eine akzeptable Option zur medikamentösen Behandlung ist die Chirurgie. Eine ileoanale Pouch-Operation ist indiziert bei fulminantem Verlauf, elektiv bei schweren, rezidivierenden Schüben und bei Versagen der medikamentösen Möglichkeiten. Allerdings entwickelt sich dabei als häufige Komplikation in ungefähr 50 % der Fälle nach 10 Jahren eine Pouchitis (Lohmuller 1990). Therapeutisch wird die akute Pouchitis mit Antibiotika (Metronidazol) behandelt. Zur remissionserhaltenden Therapie der chronischen Pouchitis werden nach neueren Erkenntnissen Probiotika eingesetzt (Herrlinger 2002).

1.2 Epidemiologie

Da die Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen noch weitgehend unbekannt ist, sind epidemiologische Beobachtungen äußerst hilfreich, um die wahren Ursachen und Risikofaktoren dieser Krankheiten zu identifizieren und den Weg zur effektiven Therapie zu finden. Weltweit ist die Epidemiologie beider Krankheiten nicht einheitlich. Auffällig ist die geographische Verteilung. Global zeigt sich ein Nord-Süd- und West-Ost-Gefälle. Dabei werden die höchsten Inzidenzen in den westlichen und industrialisierten Regionen der Welt beobachtet. An erster Stelle stehen Nordamerika, Skandinavien und Großbritannien. Die geringsten Inzidenzen finden sich dagegen in Asien (Farrokhyar 2001). Seit dem zweiten Weltkrieg und v.a. in den 1960er und 1980er Jahren stiegen die Inzidenzraten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen in den westlichen Ländern an, um das jetzige Plateau zu erreichen.

In den USA mit etwa 1 Million Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten ereignen sich über 300.000 neue Fälle pro Jahr (Hanauer 2006). Die Inzidenzraten für Kanada und USA bewegen sich dabei zwischen 2,2 – 14,3/100.000/Jahr für Colitis ulcerosa und 3,1 – 14,6/100.000/Jahr für Morbus Crohn mit Prävalenzen zwischen 37 – 246/100.000 für Colitis ulcerosa und 26 – 199/100.000 für Morbus Crohn (Loftus 2004).

In Europa sieht es ganz ähnlich aus. Verschiedene Studien erbrachten Inzidenzen von 1,5 – 24,5/100.000/Jahr für Colitis ulcerosa und 0,7 – 11,6/100.000/Jahr für Morbus Crohn bei einer Prävalenz zwischen 21 – 268/100.000 für Colitis ulcerosa sowie 9 – 156/100.000 für Morbus Crohn (Binder 2004, Farrokhyar 2001). Insgesamt ergeben sich quer durch Europa ungefähr 2,2 Millionen CED-Leidende mit 50.000 – 68.000 Colitis ulcerosa – und 23.000 – 41.000 Morbus Crohn – Neuerkrankungen pro Jahr (Loftus 2004).

Seit Ende der 1980er Jahre ist dieser Anstieg in den stark betroffenen Ländern zurückgegangen. Aber dafür zeigt sich jetzt in den Ländern Südeuropas und Asiens ein stetiges Wachstum. Zuverlässige Ergebnisse weisen dafür nur Japan und Korea auf. In Japan liegt die Inzidenz bei 1,95/100.000/Jahr für Colitis ulcerosa und 0,51/100.000/Jahr für Morbus Crohn und die Prävalenz bei 18,12/100.000 für Colitis ulcerosa und 5,85/100.000 für Morbus Crohn, was immer noch unter dem europäischen Durchschnitt liegt (Yang SK 2001). Ursache scheint sowohl die zunehmende Industrialisierung und der wachsende Einfluss des westlichen Lebens- und Ernährungsstils als auch der technische Fortschritt mit verbesserter medizinischer Diagnostik und therapeutischen Möglichkeiten in den asiatischen Ländern zu sein. Der Unterschied zwischen Nord und Süd tendiert auch weiterhin zu schrumpfen und wird später kaum noch eine große Rolle spielen (Garrido 2004).

Weitere mögliche Erklärungen für die verschiedenen Inzidenzen und Prävalenzen auf der Welt können Volks- und Rassenunterschiede sein. Obwohl die Daten begrenzt sind, scheint es, dass Amerikaner mit asiatischem oder hispanischem Hintergrund weniger wahrscheinlich CED v.a. Morbus Crohn entwickeln. Andere Studien zeigten, dass die Prävalenz von Morbus Crohn bei der afrikanischen Bevölkerung ungefähr zwei Drittel von der der Kaukasiern ausmacht (Kurata 1992, Blanchard 2001, Sonnenberg 1991). Es wurden aber auch schon ganz andere Ergebnisse veröffentlicht. So wurde z.B. bei asiatischen Einwanderern nach Europa spätestens nach der ersten Generation kein großer Unterschied mehr zur europäischen Bevölkerung gefunden (Fellows 1990, Probert 1992, Carr 1999). All diese Untersuchungen zeigen, dass Volks- und Rassenunterschiede sowohl auf Umweltfaktoren als auch auf genetische Unterschiede zurückzuführen sind.

Das bevorzugte Manifestationsalter liegt zwischen 15 – 25 Jahren für Morbus Crohn und 25 – 35 Jahren für Colitis ulcerosa. Daneben gibt es noch einen zweiten Erkrankungsgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. In der Geschlechterverteilung haben die Frauen beim Morbus Crohn Übergewicht, während bei der Colitis ulcerosa mehr Männer vertreten sind (Karlinger 2000, Timmer 2003).

Die Überlebenswahrscheinlichkeit und die Sterblichkeitsrate hängen stark von anderen Faktoren ab. Eine höhere Sterblichkeit findet sich bei hohen Inzidenzen, spätem Manifestationsalter, schwereren Krankheitsverläufen mit Komplikationen und schwacher Wirksamkeit der Therapie. Neuere Daten weisen darauf hin, dass Betroffene mit Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn eine gleiche Lebenserwartung wie die Normalbevölkerung haben. Nur unter Morbus Crohn – Patienten wies man teilweise eine erhöhte Sterblichkeit nach zehn Jahren nach (Wolters 2006). Allerdings gibt es Unterschiede in den einzelnen Subgruppen des Morbus Crohn (Jess 2006). Generell zeigen Patienten mit anderen gastrointestinalen Krankheiten, malignen Tumoren oder Atemwegserkrankungen (z.B. COPD), schweren Krankheitsverläufen und hohem Alter eine leicht erhöhte Sterblichkeit (Gyde 1982, Ekbohm 1992, Langholz 1997, Card 2003, Winther 2003).

1.3 Ätiologie

Bisher wurden zahlreiche ätiopathogenetische Modelle für CED beschrieben, die aber bis heute noch nicht definitiv bestätigt wurden. Die Ätiologie dieser Krankheiten scheint multifaktoriell zu sein, wobei die vorherrschende Theorie ist, dass CED das Ergebnis einer abnormen Immunantwort getriggert von Umweltfaktoren bei genetisch prädisponierten Individuen sind (Sartor 2006, Packey 2008). Um die Ursachen klarstellen zu können, muss man die Antworten auf folgende Fragen kennen: Wie kann sich das intestinale Immunsystem in Anwesenheit von luminalen Pathogenen in einem kontrollierten Entzündungszustand halten und wie wird diese Toleranz bei CED-Patienten unterbrochen (Farrokhyar 2001, Kirsner 2001, Isaacs 2005, Vavricka 2009)?

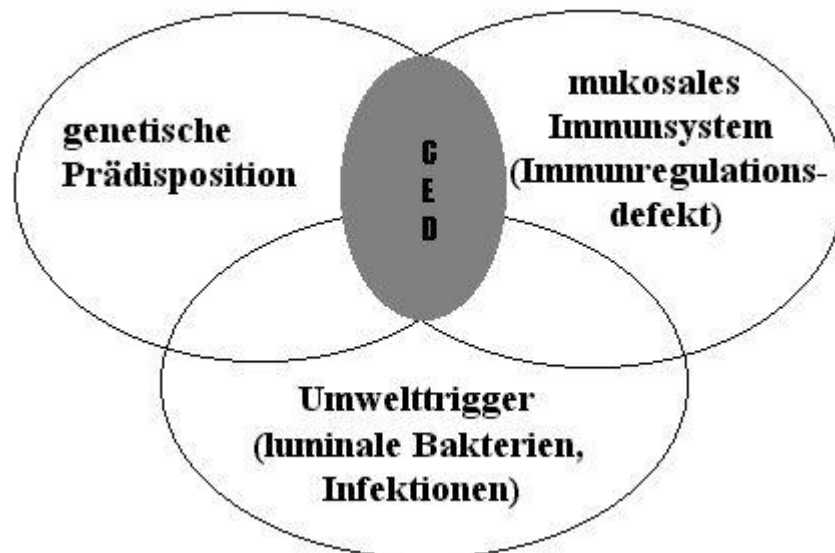


Abbildung 1.1 Pathogenesemodell chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

1.3.1 Umweltfaktoren

Das Auftreten der CED ist eng mit dem Lebensstil westlicher Industriegesellschaften verbunden. Klare Hinweise darauf liefern epidemiologische Studien (s.o.). Die Identifikation verantwortlicher Einzelfaktoren durch eine globale epidemiologische Analyse scheint aber fast unmöglich. Es wurden dennoch für manche Umstände klare Bezüge gefunden (Schreiber 2002). Bisher sind viele verschiedene Umwelteinflüsse im Gespräch. Dazu gehören u.a. Rauchen, Ernährung, Stadt- oder Landleben, sozioökonomischer Status, Stress, Medikamente,

Infektionskrankheiten in der Kindheit, häusliche Hygiene und die Darmflora (Baumgart 2007, Hugot 1999, 2003a, Fiocchi 2005, Korzenik 2005, Ferguson 2007).

Der wichtigste Umweltfaktor ist die bakterielle Darmflora. Obwohl bisher keine spezifischen Keime als Krankheitsauslöser identifiziert werden konnten, gibt es eine Fülle von direkten und indirekten Hinweisen für eine pathogenetische Rolle mikrobieller Faktoren (Barnich 2007, Rath 2003, Shih 2008). Hierfür spricht bereits die häufige Manifestation der Erkrankungen in den Darmarealen Ileum und Kolon mit den höchsten Bakterienkonzentrationen. Ferner konnte tierexperimentell in den meisten CED-Modellen gezeigt werden, dass Tiere unter keimfreien Bedingungen keine intestinale Entzündung entwickelten (Sartor 1999, Taurrog 1994). Sobald aber gewöhnliche Darmbakterien eingeführt wurden, kam es sehr rasch zu einer mukosalen Entzündungsreaktion (Balish 2002, Rath 2001). Die Triggerfaktoren bei Colitis ulcerosa-Patienten sind möglicherweise epitheliale Antigene oder pathogene Aerobier. Bei Morbus Crohn scheinen als Antigene anaerobe Bakterien und bakterielle Zellwandbestandteile zu agieren (Sartor 1999, Hanauer 2006). Zudem kann die Unterbrechung der Darmpassage durch einen Anus präter distal gelegene Darmläsionen beim Morbus Crohn zur Abheilung bringen, während es nach Wiederherstellung der Passage zu Rezidiven kommen kann (Holtmann 2002).

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben versucht, spezifische Bakterien oder Viren als kausale Krankheitserreger bei CED zu identifizieren (Bleich 2005, Farrell 2002, Ohkusa 2004). Das erste suspektete Bakterium war *Mycobacterium paratuberculosis*, weil es wie Morbus Crohn zu einer granulomatösen Erkrankung führt (Bernstein 2004, Borgaonkar 2000, Chamberlin 2001, 2006, Hermon-Taylor 2000, Hubbard 1999, Sartor 2005). Dann wurden noch viele andere Erreger wie Yersinien (Treacher 1985), *Campylobacter*, Clostridien (Greenfield 1983), Chlamydien, *Helicobacter* spp. (Burich 2001), *Proteus*, *Pseudomonas*, Listerien (Liu 1995), Shigellen, Salmonellen, *E. coli* (Burke 1988, Darfeuille-Michaud 2004), Cytomegalieviren (Rachima 1998) oder Masernviren (Robertson 2001, Wakefield 1995) als Krankheitsauslöser diskutiert. Währenddessen scheinen Lactobacillen und Bifidobakterien eine protektive Wirkung zu haben (Madsen 1999a, 2001, McCarthy 2003, Schultz 2002, Shiba 2003). Eine eindeutige Evidenz für diese Hypothesen fehlt jedoch. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Zusammensetzung der Darmflora bei Patienten mit Morbus Crohn verändert ist. Hierbei kommt es neben einer Erhöhung der intestinalen Bakterienkonzentration möglicherweise zu einem vermehrten Eindringen von Bakterien in die Mukosa des Darmes (Swidsinski 2002). Begünstigend hierfür ist eine intestinale Barrierestörung, wobei umstritten ist, ob diese

sekundär durch die intestinale Entzündungsreaktion entsteht oder ein primärer, kausaler Faktor in der Pathogenese darstellt (Hilsden 1996, Madsen 1999b, von Ritter 1988).

Nahrungsmittel scheinen über einen indirekten Einfluss auf die Krankheitsentwicklung zu verfügen, weil sie zusammen mit den Bakterien die häufigsten Antigene im Darm präsentieren. Sie tragen ihren Teil dazu bei, inzidentelle Unterschiede zu erklären. Einen negativen Einfluss haben Zucker (Martini 1976, Riordan 1998, Krishnan 2002) und Fettsäuren in hohem Konsum, wie sie in fast food enthalten sind (Persson 1992, Shoda 1996, Reif 1997, Geerling 2000). Auch andere Nahrungsmittel des 20. Jahrhunderts wie Margarine, Kornflakes, Kaugummi, Schokolade und Cola wurden schon in diesem Zusammenhang erwähnt (Russel 1998). Dagegen spricht ein hoher Verbrauch an Ballaststoffen, Obst und Gemüse für einen protektiven Effekt gegen eine CED-Entwicklung (Persson 1992, Reif 1997, Russel 1998). Aber diese Erkenntnisse führten bis heute noch nicht zu einer effektiven Diät Empfehlung für Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa.

Die Grundlage eines funktionierenden Immunsystems wird bereits in der Kindheit gelegt. Hierbei gibt es zwei gegensätzliche Hypothesen. Die erste konzentriert sich auf Infektionskrankheiten in der Perinatalperiode (Mesquita 2008). Dabei spielen virale (v.a. Masern) (Wakefield 1995, Ekblom 1994) und bakterielle Infekte, besonders Pharyngitis und Tonsillitis (Ekblom 1990b) eine große Rolle, auch wenn sich in der Literatur nicht alle darin einig sind (Jones 1997, Pardi 1999, Robertson 2001). Die zweite Hypothese dagegen gründet auf der „behüteten Kind“ – Theorie. Darin findet sich eine positive Assoziation mit höherem sozioökonomischen Status und verbesserten Hygienestandard. Diese Kinder werden sog. „notwendigen“ Antigenen zu spät ausgesetzt, um eine normale, adäquate und suffiziente Immunantwort zu produzieren (Karlinger 2000). Daneben ist auch wieder die Familiengröße von Bedeutung. Hier zeigt sich in Studien ein erhöhtes Risiko für Kinder aus Kleinfamilien. Es wird davon ausgegangen, dass kleinere Familien einen höheren Standard in ihrer Kinderhygiene pflegen können (Montgomery 2002, Hampe 2003). Der Erstgeborene trägt immer das höchste Risiko. Denn das Risiko scheint indirekt proportional zur Zahl der älteren Geschwister zu sein. Ein weiterer entscheidender Punkt zur Protektion von CED in der Kindheit scheint das Stillen und die Stilldauer zu sein, da die Muttermilch das sich gerade entwickelnde Immunsystem des Kindes stärkt. Frühzeitiges Abstillen wurde mit einem erhöhten Risiko für CED assoziiert (Koletzko 1989, 1991, Klement 2004). Allerdings gibt es auch schon Gegenstimmen, die Stillen als Risikofaktor für Morbus Crohn ansehen (Baron 2005).

Der stärkste und wiederholt bewiesene einflussnehmende Faktor auf den Krankheitsverlauf ist das Rauchen. Raucher haben ein zweifach höheres Risiko Morbus Crohn zu entwickeln (Cal-

kins 1989). Bei Exrauchern bleibt das Risiko für über fünf Jahre erhöht. Danach sinkt es ab und ist gleich den Nichtrauchern. Im Gegensatz dazu hat Rauchen auf Colitis ulcerosa einen protektiven Effekt. Dabei sinkt das Manifestationsrisiko mit steigender Rauchmenge (Corrao 1998, Lindberg 1988). Eine Studie konnte zeigen, dass in gemischten CED-Familien, rauchende Geschwister eher einen Morbus Crohn entwickelten und nicht-rauchende Geschwister eher eine Colitis ulcerosa (Bridger 2002). Deshalb findet man vielleicht bei Morbus Crohn – Patienten mehr Raucher als bei Colitis ulcerosa – Patienten (Brignola 2000). Der Mechanismus dieser ungewöhnlichen Assoziation ist bislang unbekannt. Potentiell wichtige Effekte von Nikotin könnten der Einfluss auf den rektalen Blutfluss, die Beschaffenheit der Darmschleimhaut oder die Zytokin- und Eikosanoidausschüttung sein (Rubin 2000, Agarwal 2003). Versuche, diese Wirkung therapeutisch zu nutzen, haben noch nicht die gewünschten Erfolge erzielt (Pullan 1994, Thomas 1995, Thomas 1996, Sandborn 1997). Es ist möglich, dass der Benefit des Rauchens auf Colitis ulcerosa von einer höheren Nikotindosis abhängt, als das mit Pflastern erreicht werden kann, oder dass andere Komponenten des Zigarettenrauchs zu diesem positiven Effekt beitragen (Loftus 2004).

Die gleiche starke negative Assoziation wurde auch in mehreren Studien für die Appendektomie mit der Entstehung einer Colitis ulcerosa nachgewiesen (Koutroubakis 2000, 2002). Andere Studien beschreiben wiederum nach einer Appendektomie ein ansteigendes Risiko für die Entstehung von Morbus Crohn (Andersson 2003). Ähnlich wie das Rauchen dürfte auch die Appendektomie nicht nur das Auftreten sondern auch den klinischen Verlauf von Colitis ulcerosa beeinflussen. Nach einer Appendektomie diagnostizierte Colitis ulcerosa – Patienten waren älter, hatten weniger rezidivierende Symptome und bedarfen seltener einer Kolektomie oder immunsuppressiven Therapie (Naganuma 2001, Radford-Smith 2002, Cosnes 2002). Der Mechanismus dieser positiven und negativen Wirkung auf die Entstehung beider Krankheiten ist unbekannt.

Auf Grund der weiblichen Prädomination bei Morbus Crohn wurde die Aufmerksamkeit als möglicher Risikofaktor auch auf orale Kontrazeptiva gelenkt. Es hat sich die Theorie gebildet, dass weibliche Sexualhormone ursächlich für CED mitverantwortlich sein könnten (El-Tawil 2008). Man vermutet als Effekt eine verstärkte Bildung mikrovaskulärer Thrombosen mit transient ischämisch veränderter Darmmukosa, welcher zur erhöhten Permeabilität und Absorption von luminalen Antigenen führt. Die Forschungsergebnisse gehen darin aber auseinander. Einige Autoren beschrieben eine schwache Assoziation sowohl mit Morbus Crohn als auch mit Colitis ulcerosa (Corrao 1998, Godet 1995, Rodriguez 2005), die anderen verneinen diese Verbindung (Lashner 1989, 1990). Des Weiteren wurde ein dosis-abhängiger Effekt der

Kontrazeptiva beobachtet. Das Morbus Crohn – Risiko steigt mit zunehmender Östrogenmenge oder mit der Dauer der Therapie (Katschinski 1993, Boyko 1994).

Ein weiterer umstrittener Aspekt ist der Gebrauch von NSAR. Manche Studien beschreiben eine Assoziation mit CED-Rückfällen (Forrest 2004), andere konnten das jedoch nicht bestätigen (Rodriguez 2005).

Umweltfaktoren scheinen eine wichtige Rolle in der Manifestation von CED zu spielen. Sie besitzen aber nur eine Vermittlerrolle weniger einen direkten Einfluss auf die Ätiologie. Es bedarf jedoch noch vieler weiterer Untersuchungen verbunden mit molekulargenetischen, mikrobiologischen und immunologischen Methoden, um die gesamte Ätiopathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu verstehen (Cho 2008a, Timmer 2003).

1.3.2 Genetische Faktoren

1934 berichteten der Erstentdecker und Namensgeber Burrill Bernhard Crohn und seine Kollegen zuerst von einer familiären Anhäufung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und legten damit den Grundstein in der genetischen Untersuchung dieser Krankheiten. Seitdem haben viele Untersuchungen bestätigt, dass beide Formen der CED über eine familiäre Veranlagung verfügen. Im Durchschnitt haben 6 – 8 % aller Colitis ulcerosa-Patienten und 8 – 10 % aller Morbus Crohn-Patienten mindestens einen betroffenen Verwandten in ihrer Familie (Hugot 2004).

Viele epidemiologische Daten weisen darauf hin, dass eine genetische Komponente in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eine Rolle spielt. Darunter fallen Völker- und Rassenunterschiede, die familiäre Häufung, Ergebnisse aus Zwillingsstudien und die Assoziation mit spezifischen serologischen Markern (Bonen 2003a).

Inzidenz und Prävalenz ändern sich signifikant in Abhängigkeit von der geographischen Lokalisation und vom ethnischen Hintergrund (siehe 1.2). Die USA ist ein sehr gutes Beispiel für die Beobachtungen über einen genetischen Einfluss. Die US-Bevölkerung ist aus ganz unterschiedlichen Rassen und Völkern zusammengesetzt, die aus aller Welt stammen. Insgesamt ist die Inzidenz der Erkrankungen in den vereinigten Staaten sehr hoch. Die Prävalenzen der einzelnen Bevölkerungsgruppen aber differieren untereinander. So liegen sie z.B. für Morbus Crohn bei 43,6/100.000 unter Kaukasiern, 29,8/100.000 unter afrikanischen Amerikanern, 4,1/100.000 unter Hispaniern und 5,6/100.000 unter Asiaten (Kurata 1992). Des Weiteren wurden signifikante Unterschiede in CED-Subtypen und serologischen Markern (pANCA, ASCA) unter Weißen, Afroamerikanern, Amerikanern mexikanischen Ursprungs und

Asiaten in den USA beobachtet (Basu 2005). Das größte Risiko zur Entwicklung einer CED zeigen Juden aus den vereinigten Staaten mit einer 2 – 4-mal größeren Inzidenzrate und einer 2 – 9-mal größeren Prävalenz verglichen mit Kaukasieren nicht-jüdischer Herkunft (Gilat 1986, Roth 1989, Rotter 1992, Yang H 1993, 2001, Zlotogora 1990).

Den auffälligsten Hinweis auf eine Verwicklung genetischer Faktoren in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen lieferten bisher die beobachteten familiären Häufungen. Mehrere Studien wiesen ungefähr 5 – 10 % der Patienten eine positive Familienanamnese nach (Farmer 1980, Monsen 1991, Probert 1993, Orholm 1991, Russel 1997). Das größte Risiko in der Verwandtschaft tragen die Verwandten ersten Grades (v.a. Geschwister) mit 1 – 8 %. Verwandten zweiten Grades wird nur noch ein Risiko von 0,1 – 0,2 % zugeschrieben (Binder 1996, Freeman 2002, Gaya 2006, Peeters 1996, Russell 2004, Satsangi 1996a).

75 % der Familien mit mehreren CED-Betroffenen Mitgliedern sind konkordant für die Erkrankung, während in 25 % der Familien beide Krankheiten vorkommen (Binder 1998, Bonen 2003a). Dies bestätigt wiederum die Hypothese, dass Morbus Crohn und Colitis ulcerosa polygenetische Krankheiten sind, die sich einige aber nicht alle Prädispositionsgene teilen, und nicht nach Mendel'schen Regeln vererbt werden (Ahmad 2001, Gaya 2006, Hugot 2004, Satsangi 2003). Die beste Art, dies zu untersuchen, sind Zwillingsstudien. Monozygote Zwillinge zeigen für Morbus Crohn eine Konkordanz mit 42 – 58 %, während dizygote Zwillinge nur eine Konkordanz von ca. 3 – 4 % aufweisen. Für Colitis ulcerosa liegen die Konkordanzraten bei eineiigen Zwillingen bei 6 – 17 % und bei zweieiigen Zwillingen bei 0 – 5 % (Bonen 2003a, Gaya 2006, Orholm 2000, Subhani 1998, Thompson 1996, Tysk 1988). Die hohe Konkordanz bei monozygoten Zwillingen spricht eindeutig für eine genetische Ursache. Da sie aber nicht 100% erreicht, sind auch nicht-genetische Faktoren wie z.B. Umwelteinflüsse als mitverantwortlich zu betrachten.

Neben den traditionellen Diagnoseschritten wie Radiologie, Endoskopie und Histologie kommt seit neuestem auch die Bestimmung spezifischer Antikörper als Serummarker für beide Krankheiten in Frage (Dubinsky 2006). Dazu gehören die perinukleären antineutrophilen Zytoplasma-Antikörper (pANCA), die anti-Saccharomyces-cerevisiae-Antikörper (ASCA) oder die Autoantikörper gegen exokrines Pankreas (PAB). Das Vorkommen von pANCA korreliert mit Colitis ulcerosa (Duerr 1991, Lee 1995, Oudkerk 1993, Satsangi 1998, Seibold 1994, Shanahan 1992), während im Falle des Morbus Crohn ASCA als serologischer Marker bei der Mehrheit der Patienten nachgewiesen werden (McKenzie 1990, Seibold 2001, Sendid 1998, Sutton 2000, Vermeire 2001). PAB kommen nur mit einer Prävalenz von 30% bei Mor-

bus Crohn – Patienten vor (Folwaczny 1998, Joossens 2004, Seibold 1997, Stocker 1987). Die Expression von ANCA und ASCA scheint aber auch eine familiäre Häufung zu haben. Bei gesunden Verwandten von Colitis ulcerosa-Patienten werden häufiger pANCAs nachgewiesen. Auch Verwandte, die nicht denselben Haushalt mit den Kranken teilen, haben eine erhöhte ANCA im Blut. Diese Beobachtungen einer familiären Aggregation von ANCA beweisen wiederum die Beteiligung genetischer Faktoren. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich bei Verwandten von Morbus Crohn-Patienten (Folwaczny 1997, Sendid 1997, Shanahan 1992, Sutton 2000, Yang H 1995, 2001). Aber weder pANCA- noch ASCA-Antikörpertests sind sensitiv genug, um als Screeningtests zur Diagnostik benutzt zu werden. Sie können wegen ihrer relativ hohen Spezifität nur zur Differentialdiagnostik von Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und indeterminate colitis herangezogen werden (Sandborn 2001, Quinton 1998).

Klinisch kann man den Phänotyp der familiären von der häufigeren sporadischen Form beider Krankheiten bis auf einen früheren Krankheitsbeginn nicht eindeutig unterscheiden. Des öfteren wurden auch unterschiedliche Lokalisationen diskutiert. So war z.B. der familiäre Morbus Crohn mit häufigerer Lokalisation im Ileum als im Kolon und mit häufigerem Auftreten von Abszessen assoziiert. Die familiäre Colitis ulcerosa war häufiger mit einer Pankolitis assoziiert. Aber der Schweregrad der Krankheit war im Vergleich zu den sporadischen Fällen gleich (Monsen 1987, Carbonnel 1999, Colombel 1996, Halme 2002, Polito 1996). Die genetische Determinante zeigt sich nicht nur im Phänotyp der CED selbst sondern auch in der Assoziation zu anderen Krankheiten, wie die ankylosierende Spondylitis (Mallas 1976, Purrmann 1988), Psoriasis (Yates 1982, Lee 1990) und die primär sklerosierende Cholangitis (Olsson 1991, Rasmussen 1992), oder Syndromen wie Turner-Syndrom (Price 1979, Hayward 1996), Hermansky-Pudlak Syndrom (Schinella 1980, Mahadeo 1991, Gahl 1998) und die Glykogenspeicherkrankheit Typ 1b (Couper 1991, Roe 1992).

1.3.3 Das mukosale Immunsystem

Epidemiologische und familiäre Studien lieferten den Beweis, dass genetische Faktoren zur Entwicklung von CED beitragen. Es ist aber auch klar, dass genetische Determinanten nicht alleine die Entstehung der Krankheiten erklären können. Ein wichtiger Faktor scheint der Verlust der Immuntoleranz gegenüber der bakteriellen Darmflora zu sein (Chamberlin 2006, Folwaczny 2003, Korzenik 2000, Swidsinski 2009). Die Darmmukosa ist täglich Millionen von potenziell schädlichen Antigenen von Nahrungsbestandteilen, Viren, Bakterien und deren Produkte ausgesetzt. Um diese Aufgaben zu bewältigen, besitzt der Darm ein komplexes,

hochstrukturiertes mukosales Immunsystems. Hierdurch ist der Gastrointestinaltrakt in der Lage, gegenüber selektierten Antigenen eine effektive Immunantwort zu generieren, andererseits jedoch keine inflammatorische Antwort auf die meisten Antigene auszubilden, was unter den Terminus der „Toleranz“ fällt (Holtmann 2002, Strober 2002).

Die normale Darmwand enthält eine Vielzahl von immunkompetenten Zellen, wie intraepitheliale Lymphozyten, Epithelzellen, Ig-A-produzierende B-Zellen, T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen) der Peyer'schen Plaques und der Lamina propria. Bei CED-Patienten ist das homöostatische Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen des intestinalen Immunsystems gestört (Neurath 2002). Bei CED stehen spezifische proinflammatorische Immunantworten von T-Lymphozyten gegenüber bakteriellen Antigenen, welche über spezialisierte Epithelzellen, genannt M-Zellen (Kagnoff 1997, Shanahan 2000), und subepitheliale dendritische Zellen (Rescigno 2001) aufgenommen werden, im Mittelpunkt. Das von den APCs produzierte Zytokin IL-12, das eine Zelldifferenzierung von T-Zellen in Th1, Th2, Th3 und Tr bewirkt, spielt hierbei eine wichtige Rolle. Während Typ1- und Typ2-Helferzellen v.a. proinflammatorische Zytokine (Th1: IFN- γ , TNF- α ; Th2: IL-4, 5, 13) im Darm produzieren, produzieren regulatorische T-Zellen und Typ3-Helferzellen vorwiegend antiinflammatorische Zytokine (Tr: IL-10; Th3: TGF- β) (Powrie 1995).

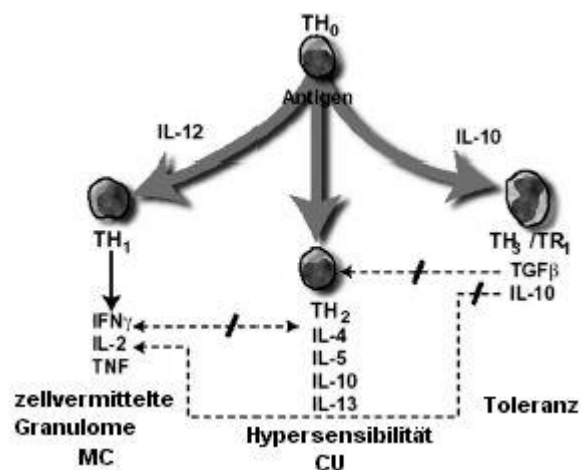


Abbildung 1.2 Pathway der T-Lymphozytenaktivierung

MC ist mit einem Th1-Zellphänotyp assoziiert, welcher von IL-12 vermittelt wird und durch Produktion von IFN- γ , IL2 und TNF charakterisiert ist. CU ist mit einem atypischen Th2-Phänotyp assoziiert, welcher durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-13 und anderen Zytokinen charakterisiert ist. Bei oraler Toleranz werden durch IL-10 T-Suppressorzellen, Th3 oder T-Regulationszellen (Tr) aktiviert, welche die herabregulierenden Zytokine IL-10 und TGF- β produzieren (modifiziert nach Hanauer 2006).

Beim Morbus Crohn kommt es zu einer überschießenden Th1-Antwort mit vermehrter Produktion von $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ (Fuss 1996, Plevy 1997). Diese Zytokine führen zur erneuten Aktivierung von Makrophagen und tragen zur Epithelschädigung und über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen auch zur Gewebsdestruktion bei (Schuppan 2000, Pender 1997). Dagegen findet sich bei Colitis ulcerosa eine Erhöhung der Th2-produzierten Zytokine IL-5, 6 und 10, welche zur B-Zellaktivierung und Autoantikörperproduktion bei dieser Erkrankung beitragen (Fuss 1996, Inoue 1999). Bei beiden Krankheiten zeigt sich ein erhöhter IL-16-Spiegel (Seegert 2001). IL-16 wird genauso von T-Zellen produziert und stimuliert die Expression und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und IL-15 in Monozyten (Mathy 2000). Ein weiterer wichtiger T-zellassoziierter Pathomechanismus beim Morbus Crohn ist eine erhöhte Apoptoseresistenz von Lamina propria – T-Zellen, wodurch eine T-Zellakkumulation im Darm und eine Perpetuierung der Erkrankung vermittelt werden (Boirivant 1999, Ina 1999, Lichtenberger 2004). Hierfür könnte eine vermehrte IL-6 – und $\text{TNF-}\alpha$ – Signaltransduktion verantwortlich sein. Eine Unterbrechung dieser beiden Signaltransduktionswegen führt zu einer Apoptose von T-Zellen im Darm und tierexperimentell zu einer Suppression einer etablierten Darmentzündung (Atreya 2000, Sartor 1997, 2006, Shanahan 2002, Holtmann 2002).

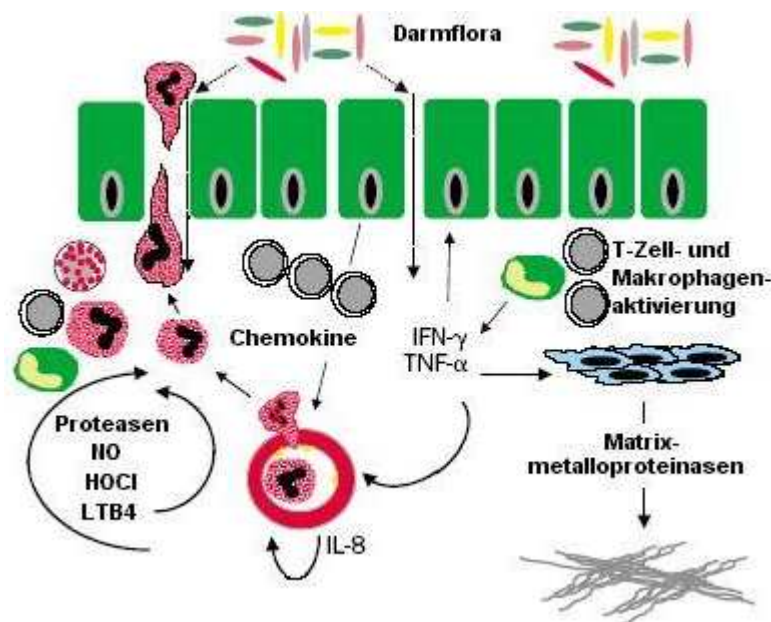


Abbildung 1.3 Gewebedestruktion und Verstärkung der Entzündungsantwort bei Morbus Crohn

Die Aktivierung von T-Zellen und Makrophagen generiert entzündungsaktive Zytokine. Diese tragen zur Freisetzung und Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen bei, welche das Gewebe zerstören. Außerdem ändert sich durch die Zytokinaktivierung die epitheliale Permeabilität und es können vermehrt Bakterien einwandern und weitere Entzündungszellen rekrutiert werden, wodurch die Entzündung zusätzlich aufrecht erhalten wird (modifiziert nach Shanahan 2002)

Zusätzlich zu dem zellulären Netzwerk gibt es noch andere Komponenten, die genauso wichtig sind für eine regelrechte Immunantwort. Die mechanische Barrierefunktion des intestinalen Epithelgewebes schützt aktiv und kontinuierlich vor dem Eindringen pathogener Mikroorganismen, die sich im Lumen aufhalten. Deshalb ist ein rascher Reparaturprozess geschädigter Epithelzellen zur Aufrechterhaltung dieser Barriere notwendig. Außerdem werden noch viele verschiedene antimikrobielle Peptide von den Epithelzellen produziert, was zu einer sofortigen Bekämpfung der Krankheitserreger führt. Eine Schädigung des Darmepithels mit Durchbrechen der mukosalen Barriere, wie es bei CED häufig der Fall ist, führt zu einer erhöhten Invasion von Bakterien und Viren gefolgt von einer dauerhaften Entzündungsreaktion (Yuan 2004).

Der Darm ist jeden Tag einer Vielzahl an verschiedenen Bakterien, bakteriellen Produkten, Nahrungs- und anderen Antigenen ausgesetzt, ohne darauf mit einer Immunantwort zu reagieren. Dieses Phänomen der „oralen Toleranz“ ist dadurch gewährleistet, dass das mukosale Immunsystem fähig ist, die herkömmliche von der pathogenen Flora zu unterscheiden (Garside 1999, Spiekermann 2001). Das „gut-associated lymphoid tissue“ (GALT) schützt den Körper vor potentiellen Pathogenen oder unpassenden Immunantworten. Unter physiologischen Bedingungen führen pathogene Antigene zu einer örtlich beschränkten Entzündung. Durch diese Immunreaktion werden jene eliminiert. Bricht das System der Toleranz zusammen, kommt es wie im Falle von CED-Patienten aufgrund einer Imbalance zwischen suppressiven und induktiven Reaktionen zu einer Kaskade von verschiedenen Entzündungsprozessen, welche in einer chronischen Entzündungsantwort gipfelt (Kraus 2006, Stallmach 2002, Philpott 2004, Thompson-Chagoyán 2005).

Die intestinale Mikroflora umfasst in etwa 500 bakterielle Spezies mit ungefähr 10^{12} Bakterien pro Gramm Faeces im Kolon. Ihre Zusammenstellung und Vielschichtigkeit variieren quer durch den gesamten Gastrointestinaltrakt mit einer Anhäufung in Ileum und Kolon, wo auch das meiste des intestinalen lymphoid-assoziierten Gewebes ist. Es wurden einige Hypothesen formuliert, um zu erklären, wie die Mukosa zwischen Antigenen, die von der normalen Flora stammen, und denen, die durch einen pathogenen Vorgang entstehen, unterscheiden kann (Guarner 2003, Philpott 2004, Thompson-Chagoyán 2005), aber keine konnte definitiv bestätigt werden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die physiologischerweise bestehende Toleranz des mukosalen Immunsystems gegenüber der autologen Flora des Darmes bei CED-Patienten gestört ist, wodurch Immunreaktionen des Darmes gegenüber Bestandteilen der Darmflora induziert werden (Duchmann 1995). Dies könnte zu einer perpetuierten Aktivierung des mukosalen Immunsystems bei CED führen (Holtmann 2002).

1.4 Genetische Untersuchungen und mögliche krankheitsrelevante Gene

Das heutige Pathogenesemodell beschreibt Morbus Crohn und Colitis ulcerosa als komplexe polygenetische Krankheiten mit genetischer Heterogenität, die sich einige aber nicht alle Prädispositionsgene teilen. Der Phänotyp wird von Interaktionen zwischen den Allelvarianten einer Vielzahl verschiedener Gene, epigenetischen Modifikationen und von Interaktionen zwischen genetischen und umweltbedingten Faktoren bestimmt (Cho 2007, Lakatos 2006, Petronis 2000, Satsangi 2003, Yamamoto-Furusho 2007a). Genetische Kopplungsanalysen und Fall-Kontroll-Assoziations-Studien bilden bei der genetischen Untersuchung das molekulare Handwerkszeug.

1.4.1 Genetische Kopplungsanalysen

Mittels Kopplungsstudien werden chromosomale Regionen identifiziert, welche mit bestimmten Krankheiten in Verbindung stehen. Die Methode basiert auf den Kenntnissen der Meiose, währenddessen Gameten produziert werden, die jeweils ein durch cross-over der homologen Chromosomen rekombiniertes Chromosom beinhalten. Dabei hängt die Rekombinationswahrscheinlichkeit zweier Gene auf einem Chromosom von der gemeinsamen Entfernung voneinander ab. Der genetische Abstand zwischen zwei Loci wird in Centimorgans (cM) gemessen. 1 cM entspricht einer DNA-Stranglänge von ungefähr einer Million Nukleotiden. Äquivalent dazu entspricht auch die Frequenz von 1% der Rekombination einer cM-Einheit. Die Grundlage der genetischen Kartierung bilden short-tandem repeat Polymorphismen sog. Mikrosatelliten. Das Allel-Sharing dieser Marker innerhalb betroffener Verwandter spiegelt die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitssuszeptibilitätslocus wider. Wenn es signifikant größer ist, als es normalerweise erwartet wird, dann ist ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Markerlocus und einem Krankheitslocus möglich. Lander und Kruglyak haben Richtlinien aufgestellt, nach denen die Ergebnisse solcher Studien analysiert und auf statistische Signifikanz geprüft werden, um falsch-positive Kopplungsansprüche zu minimieren (Lander 1995). Die Teilnehmer der Studien können keine Eltern/Kind – Paare sein, weil sich solche Paare immer Allele teilen. Die meisten Studien benutzten Geschwisterpaare oder andere nicht Eltern/Kind – Paare. Ideal wäre es, DNA-Proben von allen Verwandten, die mit den Paaren verbunden sind, zu untersuchen (Brant 2004, Wild 2004, Taylor 2001, Duerr 2003).

1996 haben Hugot und Mitarbeiter den ersten genomweiten Scan für Morbus Crohn erfolgreich durchgeführt. Die Analyse von Allel-Modellen, die sich 40 betroffene Geschwisterpaare in 25 Familien teilen, erbrachte Hinweise auf ein Kopplungsgleichgewicht mit Assoziation eines genetischen Locus, der perizentromerischen Region von Chromosom 16, mit CED, genannt IBD1 (inflammatory bowel disease susceptibility locus 1) (Hugot 1996). Seitdem wurden viele weitere mögliche Genorte identifiziert, aber nur sieben davon erfüllen die notwendigen Kriterien einer signifikanten Kopplungsregion (Lander 1995) und wurden zunächst in voneinander unabhängigen Studien repliziert (Ahmad 2004). Diese sieben verschiedenen Regionen sind auf den Chromosomen 16q (IBD1), 12q (IBD2), 6p (IBD3), 14q (IBD4), 5q (IBD5), 19p (IBD6) und 1p (IBD7) lokalisiert. Außerdem stehen noch andere Regionen auf den Chromosomen 2q, 2p, 3p (IBD9), 3q, 4q, 7q, 11p, 12p, 14q, 16p (IBD8), 17q, 19q13 und Xp zur Diskussion (Hampe 2001a, Duerr 2002, Williams 2002, Paavola-Sakki 2003, Hampe 2002a, van Heel 2004, Ahmad 2004, Mathew 2004, Zheng 2003, Brant 2004, Ahmed 2006, Rodriguez-Bores 2007).

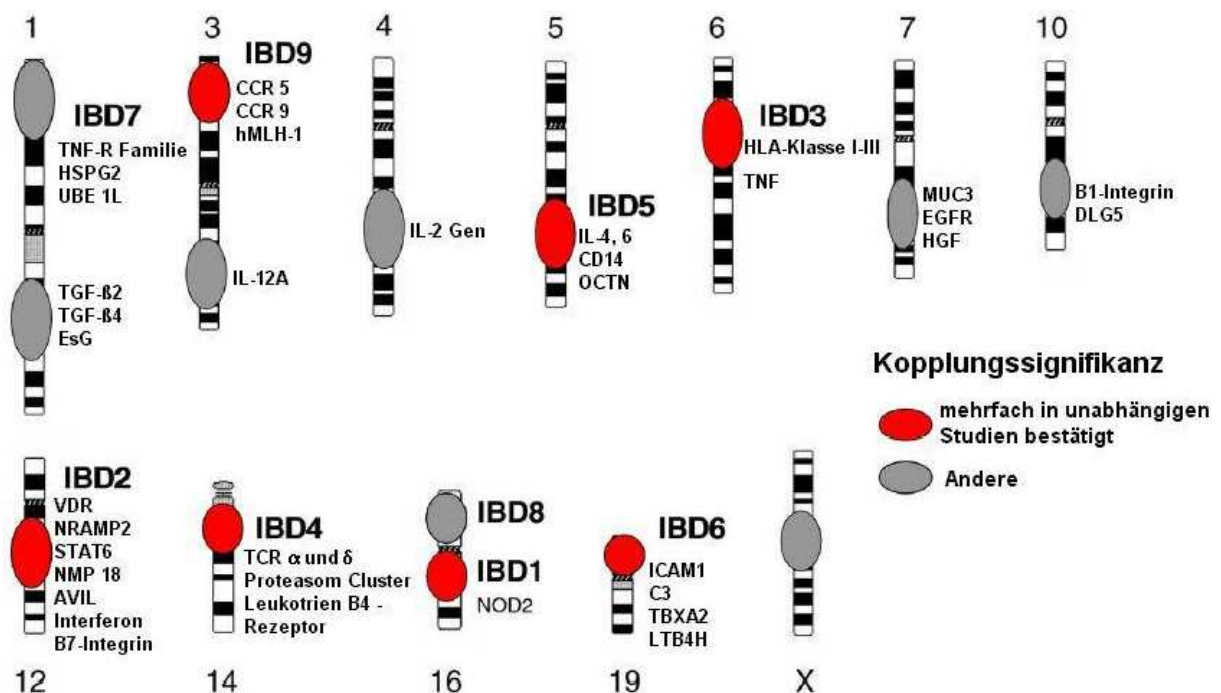


Abbildung 1.4 CED-Kopplungsregionen (modifiziert nach Ahmad 2004)

1.4.2 Genetische Assoziationsstudien

Genomweite Scans können nur relativ große Bereiche mit hunderten von Genen identifizieren. Mit Hilfe von Assoziationsstudien kann das Ganze noch feiner abgestimmt werden und bestimmte Prädispositionsgene für eine Krankheit gefunden werden. Assoziationsstudien sind Fall-Kontroll-Studien, welche Unterschiede von Allelfrequenzen eines Prädispositionsgens in Patienten im Vergleich zu Kontrollindividuen testen. Wenn eine Assoziation mit einem bestimmten Allel gefunden wird, lässt dies an eine kausale Beziehung denken (Taylor 2001, Bonen 2003a).

1.4.3 Kopplungsregionen und Kandidatengene vor der Ära genomweiter Assoziationsstudien

IBD1 (NOD2)

Der IBD1-Locus auf Chromosom 16 ist die bestreplizierteste Region mit positiver Verbindung zu Morbus Crohn und nicht zu Colitis ulcerosa. Nach Hugot et al. wurde die Assoziation dieser Region mit Morbus Crohn in zahlreichen Studien bestätigt (Hugot 1996, Ohmen 1996, Brant 1998, Cavanaugh 1998, Annese 1999, Curran 1998, Cavanaugh 2001, Zouali 2001, Williams 2002, Russel 2004, Yamamoto 2009).

Nach dem genomweiten Scan 1996 gelang es wiederum Hugot und seinen Mitarbeitern 2001, das erste mit Morbus Crohn assoziierte Gen mit 11 Exons im IBD1-Locus zu identifizieren (Hugot 2001). Das Gen kodiert ein 1031-Aminosäuren-großes Protein mit einer nucleotide-binding oligomerization domain (NOD2), einem Mitglied der NACHT (NAIP, CIITA, HET-E and TP1) – LRR (leucine-rich repeat) – Familie (die NLR-Familie), welche alle als intrazelluläre Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch Erkennen spezifischer mikrobieller Komponenten Entzündungsreaktionen hervorrufen (Chamaillard 2003, Philpott 2004, Murray 2005, Strober 2006).

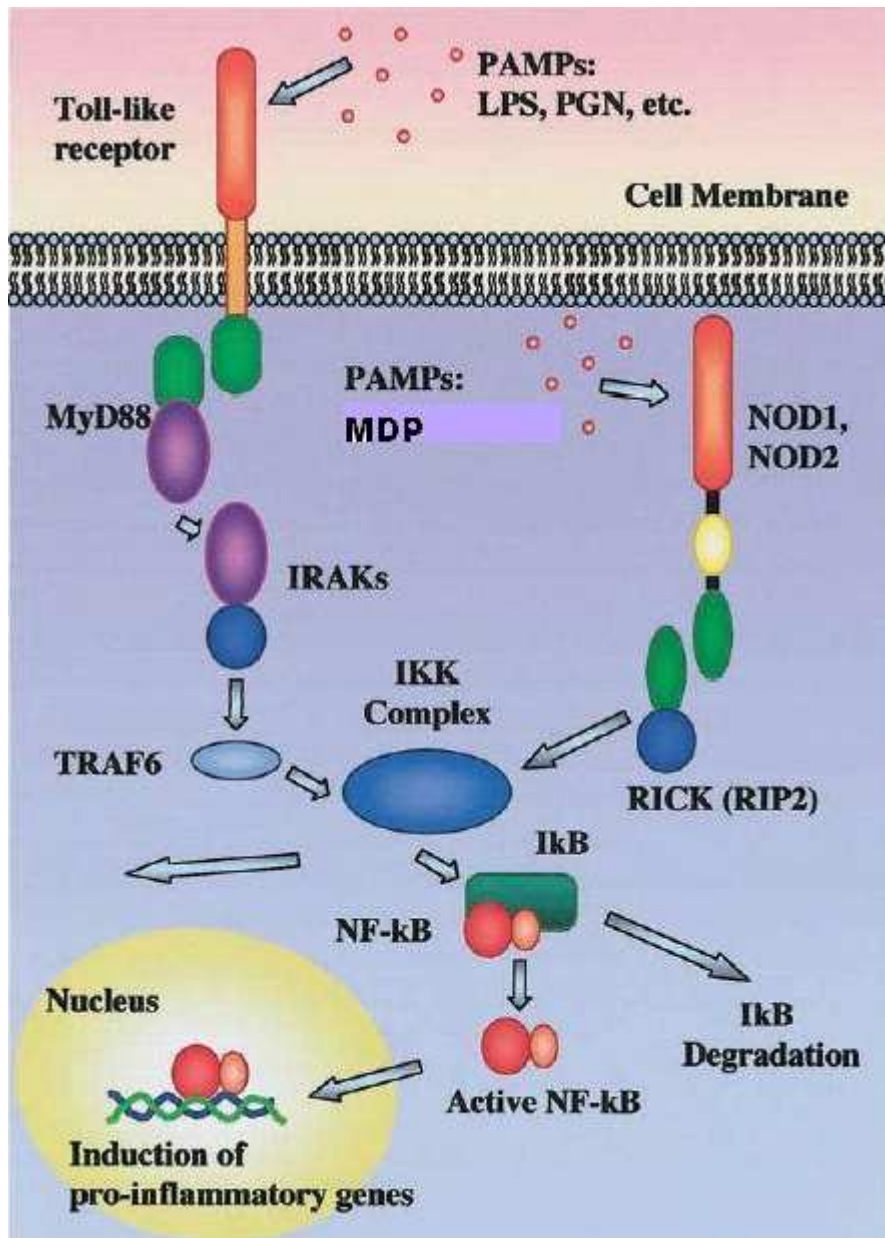


Abbildung 1.5 Funktion des NOD2-Proteins

NOD2 fungiert als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile ähnlich wie Toll-like-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und führt zur NFκB-Aktivierung mit nachfolgender Induktion proinflammatorischer Gene (Bonen 2003a)

NOD2 wird in antigenpräsentierenden Zellen, wie peripheren Monozyten und dendritischen Zellen, und Epithelzellen (v.a. Paneth-Zellen) exprimiert und ist als zytosolischer Rezeptor an der Regulation der NF-κB-Aktivierung als Antwort auf Peptidoglykane bzw. speziell die Untereinheit Muramyl-Dipeptid (MDP), aus der Zellwand Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien beteiligt (Chamaillard 2003, Philpott 2004, Eckmann 2005, Kambe 2005, Murray 2005, Strober 2006). NF-κB ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in der Aktivierung verschiedener Gene der akuten Phase – Antworten des Immunsystems inne hat, und zum Expressionsanstieg von vielen Cytokinen (TNF-α, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12), Enzy-

men (inducible nitric oxide synthase iNOD), Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, Selektine, VCAM-1), T-Zellrezeptor und MHC Klasse II Molekülen führt (Viscido 2005).

Der N-Terminus von NOD2 enthält 2 CARD Domänen, welche die Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Die zentrale nukleotid-bindende Domäne sorgt für die Self-oligomerization, die für die Aktivierung notwendig ist. Von besonderer Wichtigkeit ist die C-terminale leucinreiche LRR – Domäne, die Hauptstruktur, welche die Funktion als pattern-recognition Rezeptor für bakterielle Peptidoglykane und deren Untereinheit MDP übernimmt (Chamaillard 2003, Girardin 2003a, Inohara 2003).

Es gibt drei Hauptmutationen im NOD2, die entweder in oder neben der LRR-Domäne liegen und mit Morbus Crohn assoziiert sind: zwei missense Mutationen Arg702Trp (R702W) in Exon 4 und Gly908Arg (G908R) in Exon 8 und eine Insertionsmutation Leu1007fsinsC (1007fs, 3020insC) in Exon 11 (Ahmad 2002, Bonen 2003b, Cuthbert 2002, Hampe 2001b, Hugot 2001, Lesage 2002, Ogura 2001, Vavassori 2002, Vermeire 2002).

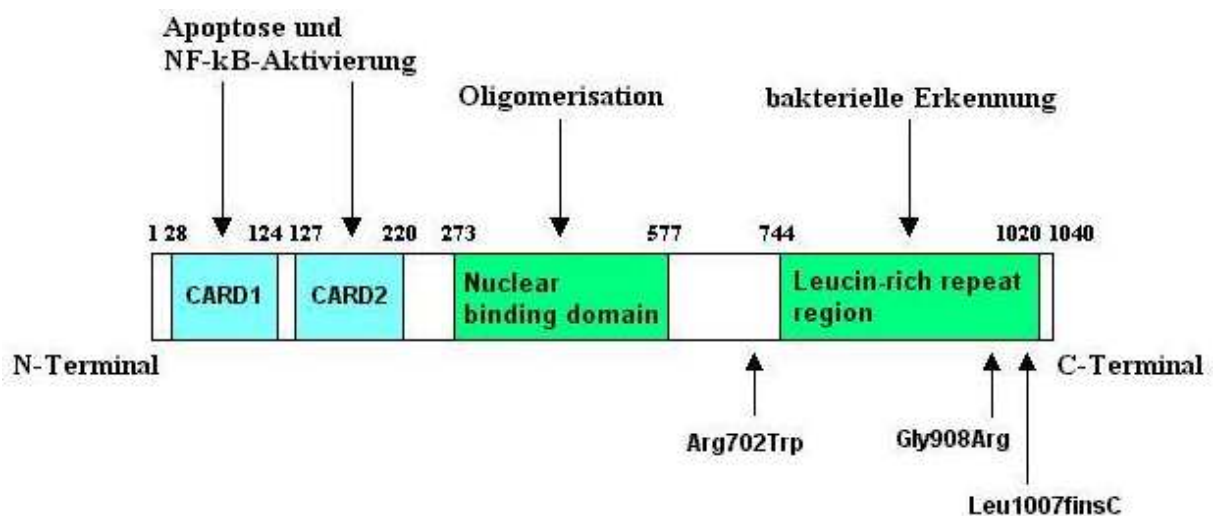


Abbildung 1.6 Struktur und funktionelle Domänen des NOD2-Gens mit Lokalisation der MC-assoziierten Mutationen. Die Zahlen repräsentieren die Aminosäurepositionen im NOD2-Protein (modifiziert nach Ahmad 2004)

Diese Mutationen führen zur Unfähigkeit, dass NOD2-Proteine bakterielle Bestandteile bzw. MDP erkennen (Girardin 2003a, Inohara 2003).

10–30 % aller Morbus Crohn-Patienten sind heterozygot für eine dieser drei Mutationen, während 3–15% der Patienten entweder homozygot oder compound heterozygot sind. Im Vergleich dazu sind 8–15 % gesunder Kontrollen homozygot und 0–1 % heterozygot für diese NOD2-Mutationen (Hugot 2001, Ogura 2001, Hampe 2001b, Bonen 2003a, Ahmed 2006). Erst kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass in vielen gesunden Verwandten ersten Gra-

des von Morbus Crohn – Patienten eine hohe intestinale Mukosapermeabilitätsstörung mit der Anwesenheit der NOD2 1007fs – Mutation assoziiert ist, welche bei diesen Individuen zu einem höheren Risiko, Morbus Crohn zu entwickeln, führen könnte (Buhner 2006). Das relative Risiko, an einem Morbus Crohn zu erkranken steigt auf das Zwei- bis Vierfache beim Vorliegen eines mutierten NOD2-Allels im Vergleich zu den Wildtypindividuen. Das Tragen von zwei Mutationen lässt das Risiko auf das 20 – 40-fache steigen. (Ahmad 2004, Hampe 2001b, Török 2001, Yamamoto-Furusho 2006).

Die Assoziation von NOD2-Mutationen mit Morbus Crohn weicht unter den Bevölkerungen aller Welt auffällig voneinander ab (Cavanaugh 2006). Obwohl die Assoziation mit der Krankheit in einigen europäischen (Hampe 2001b, Lesage 2002, Ahmad 2002, Cuthbert 2002, Radlmayr 2002, Murillo 2002, Linde 2003), nordamerikanischen (Abreu 2002, Bonen 2003b), israelischen (Fidder 2003) und australischen (Cavanaugh 2003) Kohorten belegt wurde, haben andere Studien gezeigt, dass diese Assoziation bei anderen ethnischen Gruppen wie z.B. den Finnen (Heliö 2003), Iren (Bairead 2003) oder Schotten (Crichton 2002) schwächer ist. Des Weiteren ist die Häufigkeit der NOD2 – Mutationen in schwarzen verglichen mit weißen Kohorten geringer (Bonen 2002) und in japanischen (Inoue 2002, Yamazaki 2002), koreanischen (Croucher 2003) oder chinesischen (Leong 2003) Populationen gar nicht auffindbar. Diese ethnischen Differenzen sind ein klares Zeichen dafür, dass die NOD2-Varianten nur einen kleinen Teil der genetischen Empfänglichkeit ausmachen (Ahmed 2006, Bonen 2003a, Ahmad 2004). Das Fehlen der Mutationen in der asiatischen Bevölkerung kann auch dadurch bedingt sein, dass die Mutationen erst nach der Europa-Asien-Spaltung entstanden sind (Croucher 2003).

Innerhalb des Morbus Crohn – Phänotyps wurde ebenfalls eine ausgedehnte Heterogenität mit vielen klinischen Subtypen beobachtet, die wahrscheinlich auf verschiedene pathogenetische Mechanismen zurückzuführen ist. Das Tragen von NOD2 – Mutationen ist geprägt von einem früheren Krankheitsbeginn (Ahmad 2002, Lesage 2002), vermehrter Ileitis und rechtsseitiger Kolitis (Ahmad 2002, Cuthbert 2002, Hampe 2002b, Lesage 2002) und häufigerem Auftreten von stenosierendem und fistulierendem Krankheitsverlauf (Brant 2003a, Heliö 2003, Lesage 2002, Abreu 2002, Radlmayr 2002). Der stenosierende Phänotyp tritt mit einer dreifach größeren Häufigkeit bei Trägern zweier Mutationen im NOD2 auf als bei Wildtyp-Trägern (Lesage 2002).

Die Mutationen im NOD2 scheinen bei Sichelzellanämie und Glucose-6-Phosphat Mangel einen Risikofaktor darzustellen und gegenüber Malaria und zystischer Fibrose einen protektiver Faktor (Cooke 2001). Andere Mutationen im NOD2-Gen sind mit Krankheiten wie dem

Blau-Syndrom und der Sarkoidose assoziiert, die beide wie Morbus Crohn granulomatöse Krankheiten sind (Kambe 2005).

NOD2 gilt als bewiesener ursächlicher Risikofaktor für Morbus Crohn. Diese Erkenntnis bildet eines der größten Verständnisse im Krankheitsmechanismus (Abraham 2006, Hugot 2003b, Vermeire 2004a).

IBD2

Die meisten CED-Prädispositionsloci stehen in Verbindung zu Morbus Crohn. Eine bedeutende Ausnahme ist der IBD2-Locus auf dem langen Arm des Chromosom 12p13.2-q24.1, dem eine stärkere Verbindung zu Colitis ulcerosa nachgewiesen wurde (Satsangi 1996b, Curran 1998, Duerr 1998, Lesage 2000, Parkes 2000, Paavola-Sakki 2003, Crawford 2005, Achkar 2006). Eine Vielzahl möglicher Kandidatengene in der Nähe des IBD2-Locus wurden bereits untersucht, allerdings mit negativem Ergebnis (van Heel 2001, Stokkers 2000, Tümer 2002).

IBD3

Genomweite Scans konnten den IBD3-Locus auf Chromosom 6p21.1-23 als Kopplungsregion identifizieren, welcher den human leukocyte antigen (HLA) – Komplex umfasst und in beide Krankheiten verwickelt ist (Rioux 2000, Hampe 1999a, 1999b, Satsangi 1996c, Yang 1999, Dechairo 2001, Williams 2002). Der Komplex überspannt ~4Mb und beinhaltet 130 Gene, eingeschlossen auch die Gene der HLA Klasse I und II, die für eine normale Lymphozytenfunktion essentiell sind (The MHC sequencing consortium 1999). Nach der ersten Veröffentlichung einer HLA-Assoziation mit CED 1972 (Gleeson 1972) wurden mehr als 100 Studien publiziert, welche die Rolle von HLA bei CED untersucht haben. Das HLA Klasse II – Gen codiert ein Glycoprotein der Zelloberfläche, welches auf antigenpräsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert wird. Seine Hauptaufgabe ist es, Peptide T-Zellrezeptoren zu präsentieren und damit die T-Zellen zu aktivieren. Der Mechanismus, mit dem HLA Klasse II seinen Einfluss auf CED ausübt, ist noch unklar. Die Hypothese ist, dass bei CED eine Kreuzreaktion zwischen Peptiden der bakteriellen Darmflora und eigenen Antigenen im Darm entstehen könnte, was dann zu autoreaktiven T-Zellen führt (Ahmad 2006).

In Bezug auf die Lokalisation stehen die HLA – Allele hauptsächlich in Assoziation zur Crohn – Kolitis und dem perianalen Crohn, im Gegensatz zur Crohn – Ileitis, wo NOD2 – Allele die vorherrschende Rolle spielen (Ahmad 2002, Silverberg 2003, Newman 2004, Fernandez 2004).

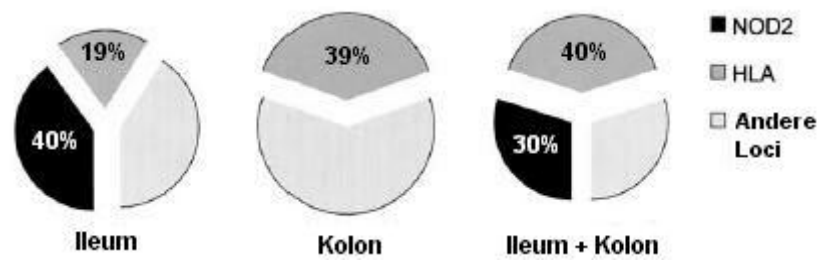


Abbildung 1.7 Anteile der drei MC-assoziierten NOD2-Varianten, der HLA-Region und anderer Loci bei Patienten gemäß der Lokalisation des Morbus Crohn (modifiziert nach Ahmad 2004)

Im Großen und Ganzen spielen die HLA-Gene a.e. als Krankheitsmodifikator und weniger als Krankheitsverursacher für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn im Krankheitsprozess eine Rolle (Ahmed 2006). Insgesamt schätzt man den Beitrag der HLA-Region zum allgemeinen genetischen Risiko auf 64 – 90% für Colitis ulcerosa und auf 10 – 33% für Morbus Crohn (Bonnen 2003a, Ahmad 2006).

IBD4

Der IBD4-Locus liegt auf Chromosom 14q11-12 und ist mit Morbus Crohn assoziiert (Ma 1999, Duerr 2000, Vermeire 2004b, Pierik 2005, Ahmed 2006). Seine ganze Größe umfasst 28 centimorgan (cM). Als mögliche Kandidatengene kommen u.a. der T-Zellrezeptor alpha und delta, ein Cluster von Proteasomen, die hämatopoetische Serinprotease, der Leukotrien B4-Rezeptor, Interleukin 17E und eine Anzahl verschiedener Apoptosegene in Frage (Duerr 2000, Pierik 2005).

IBD5

IBD5 wurde 2000 zum ersten Mal in einem genomweiten Scan bei 158 kanadischen Geschwisterpaaren als Kopplungsregion für Morbus Crohn identifiziert und ist auf Chromosom 5q31 lokalisiert (Rioux 2000, 2001). Die Kopplung konnte in den nachfolgenden Jahren von mehreren Studien bestätigt werden (Giallourakis 2003, Mirza 2003, Negoro 2003, Armuzzi 2003, Urcelay 2005, Latiano 2006). IBD5 könnte aber auch bei der Colitis ulcerosa eine Rolle spielen (Giallourakis 2003, McGovern 2003). Die funktionelle Rolle von IBD5 in der Pathogenese von Morbus Crohn ist noch unbekannt, aber die Region beinhaltet eine Menge Gene für immunregulatorische Cytokine (Interleukin 4, 5, 13), die mit in Entzündungsreaktionen verwickelt sind und potentielle Kandidatengene in der Pathophysiologie des Morbus Crohn sein können. Insgesamt überspannt Chromosom 5q31 einen 250 kb – Bereich, der fünf Gene enthält. Diese fünf Gene sind die Gene für den Interferon-Regulations-Faktor 1 (IRF1), die

organischen Kationen/Carnitin-Transporter 1 und 2 (OCTN1, OCTN2), das PDZ- und LIM-domain-Protein (PDLIM4) und die Prolyl-4-Hydroxylase (P4HA2) (Reinhard 2006).

Die transmembranären Kationentransporter OCTN1 und OCTN2 wurden als erstes untersucht und sind wichtig für die zelluläre Homöostase, indem sie beim Transportieren, Verteilen und Eliminieren von organischen Kationen mitwirken. Beide Gene sind in vielen verschiedenen Gewebearten exprimiert, darunter auch intestinale Epithelzellen, Makrophagen und T-Zellen (Wu 1999, 2000, Burckhart 2000). Es wurden zwei funktionell relevante Polymorphismen in diesem OCTN cluster gefunden, welche beim Morbus Crohn mit erhöhter Häufigkeit vorkommen (Peltekova 2004, Török 2005, Waller 2006). Diese führen zu einer verminderten OCTN-Aktivität bzw. Expression in entzündetem intestinalen Gewebe bei Morbus Crohn, was in einem reduzierten Carnitin Uptake resultiert. Carnitin ist ein essentieller Cofaktor im Lipidmetabolismus und spielt eine wichtige Rolle in der Energieproduktion der Zellen. Durch die Mutationen wird die β -Oxidation beeinträchtigt und somit auch die Bekämpfung von Pathogenen (Reinhard 2006, Ahmed 2006). Die Mutationen befinden sich im starken Kopplungsgleichgewicht, der zwei Allel-Risiko-Haplotyp kommt mit einer Häufigkeit von 54% bei Morbus Crohn – Patienten im Vergleich zu 42 % bei den Kontrollen vor.

Aber auch für die anderen drei Gene wurden bereits Assoziationen beschrieben (Silverberg 2007).

Es ist möglich, dass IBD5 als genetischer Risikofaktor wahrscheinlich für einen spezifischen klinischen Subphänotyp verantwortlich ist, wie NOD2 für die Crohn – Ileitis. Die Identifizierung solcher genetischer Risikofaktoren eröffnet die Möglichkeit, ein molekulares Klassifikationssystem zu entwickeln, um die jetzige klinische Klassifikation zu komplettieren (Ahmad 2002). Die Mehrzahl der Genotyp-Phänotyp Assoziationsstudien fand heraus, dass IBD5 mit einem frühen Krankheitsbeginn, fistulierendem Krankheitsverhalten sowie perianalem Morbus Crohn und Beteiligung des Kolons assoziiert ist (Mirza 2003, Armuzzi 2003, Crawford 2005, Török 2005, Vermeire 2005, Noble 2005a, Urcelay 2005, Latiano 2006).

IBD6

Chromosom 19p13 umfasst den IBD6-Locus und wurde mit Morbus Crohn assoziiert (Rioux 2000). Darin kommen als Kandidatengene das interzelluläre Adhäsions-Molekül (ICAM) 1, der Komplementfaktor 3, der Thromboxan-A₂-Rezeptor und die Leukotrien-B₄-Hydroxylase in Frage (Bonen 2003a, Ahmed 2006). Für ICAM1 wurde bereits eine Assoziation mit der Krankheit beschrieben (Braun 2001, Low 2004). Außerdem wurden auch komplexe Interaktionen mit NOD2 – und IBD5 – Varianten nachgewiesen (van Heel 2003).

IBD7

IBD7 liegt auf dem Chromosom 1p35 und ist mit der Colitis ulcerosa assoziiert (Cho 1998, 2000). Eines in dieser Region beinhaltendes Gen ist der transforming growth factor beta 2 (TGF-beta 2), welcher ein Zytokin codiert, das in Muttermilch vorkommt und eine Rolle in der Entwicklung von Immuntoleranz und antiinflammatorischen Antworten spielt (Rodriguez-Bores 2007). Familien, bei denen ein Kopplungsungleichgewicht zu dieser Region besteht, weisen auch eine größere Verbindung zu IBD1, was auf mögliche Gen-Gen-Interaktionen zwischen diesen zwei Loci hinweist (Bonon 2003a).

IBD 8 und 9

IBD8 wurde von Hampe et al. als zweiter IBD-Locus neben IBD1 auf Chromosom 16p12 gefunden (Hampe 2002a). Mittels Linkage Disequilibrium Mapping wurde auf dem Chromosom 3p21-26 eine weitere mögliche Kopplungsregion beschrieben, welche IBD9 genannt wurde (Hampe 2001a, Paavola 2001, Duerr 2002).

Weitere Kandidatengene

Für CED werden immer wieder Untersuchungen durchgeführt, um neue Suszeptibilitätsloci zu entdecken. Das multidrug resistance gene MDR1 kodiert das Membrantransportprotein P-Glycoprotein-1. Es kam als Kandidatengen in Verdacht, weil es sich in der Kopplungsregion auf Chromosom 7q befindet und MDR1-knockout Mäuse spontan eine Kolitis entwickeln. Der SNP C3435T in MDR1 ist mit einer geringeren intestinalen P-Glycoprotein-Expression assoziiert (Schwab 2003, Potocnik 2004). Manche Arbeiten beschreiben eine Assoziation mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, andere sprechen gegen eine Assoziation mit den Erkrankungen (Brant 2003b, Schwab 2003).

Das NOD1/CARD4 – Gen wurde wegen seiner strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zu NOD2 und seiner Lage auf Chromosom 7p14.3, einer bekannten CED – Kopplungsregion, untersucht. Anfangs wurde keinerlei Assoziation mit den Erkrankungen gefunden (Zouali 2003), später jedoch mit einem insertion/deletion Polymorphismus (McGovern 2005).

1999 wurde eine neue Kopplungsregion auf Chromosom 10 entdeckt (Hampe 1999a). Ein potentiell vielfach untersuchtes Kandidatengen in dieser Region ist das disc large homolog 5 (DLG5) – Gen. Das DLG5 – Genprodukt gehört zu der Gruppe der membranassoziierten Guanylatkinasen (MAGUKs) und trägt als solches vier PDZ-, eine SH3- und eine Guanylatkinase – Domäne, die alle an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind und somit DLG5 als multifunktionales Adapter- und Membrangerüstprotein auszeichnen. DLG5 ist hauptsächlich

für die Zellform und –polarität mitverantwortlich und in Zell-Zell-Kontakte involviert (Friedrichs 2006a). Die Stichhaltigkeit der anfänglichen Berichte, dass DLG5 ein Prädispositionsgen für Morbus Crohn wäre, wurden später durch widersprechende Ergebnisse in Frage gestellt und sorgen immer noch für Diskussionen. Insgesamt scheint DLG5 jedoch keine entscheidende Rolle beim Morbus Crohn zu spielen (Stoll 2004, Daly 2005, Newman 2006, Friedrichs 2006b, Török 2005, Noble 2005b, Vermeire 2005, Gazouli 2005, Bühning 2006, Ferraris 2006, Lakatos 2006, Tremelling 2006, van Limbergen 2009).

Gen-Gen-Interaktionen

Die Epistasis beruht auf additiven und nichtadditiven Effekten komplexer Interaktionen zwischen multiplen Varianten, welche die Vererbung beeinflussen. Nach bisherigen Beobachtungen zeigte sich, dass das gemeinsame Auftreten von NOD2-Varianten und vom IBD5 – Risiko-Haplotyp zu einem noch früheren Krankheitsbeginn des Morbus Crohn als das alleinige Vorhandensein einer dieser Varianten führt (Mirza 2003). Auch beim –857 – Promotorpolymorphismus des TNF- α -Gens im IBD3-Locus zeigte sich bei Koexistenz mit NOD2-Mutationen ein größeres relatives Risiko für Morbus Crohn (Cavanaugh 2003). Weitere Untersuchungen konnten Interaktionen zwischen verschiedenen IBD-Loci nachweisen (Crawford 2005, Shaw 2003, van Heel 2003, Mirza 2003, Bonen 2003a, Vermeire 2004b, Wehkamp 2004, Ahmed 2006). Jedoch müssen die Beobachtungen in größeren Studien bestätigt werden.

1.4.4 Die Erkenntnisse aus den neuen genomweiten Assoziationsstudien

Durch neue Technologien können in genomweiten Assoziationsstudien eine große Anzahl an SNPs im Genom direkt getestet werden. Diese haben neue Einblicke in den Pathomechanismus chronisch entzündlicher Darmerkrankungen gewährt. Mehrere neue Gene wie das Interleukin-23 Rezeptor (IL23R) Gen, das autophagy-related 16-like 1 (ATG16L1) Gen und das TNFSF15-Gen wurden entdeckt. TNFSF15 ist ein neues TNF-ähnliches Zytokin, was auf endothelialen Zellen exprimiert wird und für die Regulation der Abwehrzellen mitverantwortlich ist. ATG16L ist Teil des autophagosomen Signalwegs und ist an der Verarbeitung von intrazellulären Bakterien beteiligt. TNFSF15 und ATG16L sind beide mit Morbus Crohn assoziiert, IL23R dagegen mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. IL-23 ist ein Zytokin, welches zur Differenzierung der T-Helferzellen, v.a. in Th17-T-Zellen, beiträgt. In Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass die Untergruppe der Th17-T-Zellen chronische Entzün-

dungen unterstützt. Eine Mutation im IL23R-Gen zeigte eine protektive Wirkung vor chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Damit spielt der IL-23 Signalweg eine Rolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Entzündungen und ein neuer Therapieansatz mittels Blockade von IL-23 ist möglich (Cho 2008b, van Limbergen 2007, Gazouli 2010, Sventoraityte 2010, Lees 2009, Noomen 2009).

1.5 Das Immunsystem

Die gesamte Immunabwehr des menschlichen Organismus kann in zwei Bereiche unterteilt werden: das „angeborene“ und das „erworbene“ Immunsystem. Beide Systeme können „Fremd“ von „Eigen“ über spezialisierte Rezeptoren unterscheiden, verfügen aber über verschiedene Mechanismen, um die endgültige Elimination der Krankheitserreger zu erreichen. Das erworbene Immunsystem erkennt fremde Antigene über Oberflächenrezeptoren auf B- und T-Zellen. Um auf das weitgefächerte Sortiment an pathogenen Antigenen reagieren zu können, arbeiten die Zellen mit einem sog. Rearrangement ihrer Immunglobuline und T-Zellrezeptorgene, womit sie über 10^{11} verschiedene Arten von Antigenrezeptoren generieren können. Die Antigenbindung an diese Rezeptoren triggert eine klonale Expansion der Lymphozyten und schließlich die Produktion antigen-spezifischer Antikörper, was im Ganzen ungefähr drei bis fünf Tage dauert. Dieses hochentwickelte System wird nur in Vertebraten beobachtet. Im Gegensatz dazu ist das angeborene Immunsystem evolutionär die ältere Form der Wirtsabwehr und sowohl in Vertebraten als auch in Nicht-Vertebraten vorhanden (Hoffmann 1999, Janeway 1992, Kimbrell 2001). Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zur Bekämpfung pathogener Mikroorganismen werden auf vielen verschiedenen Zellpopulationen wie Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten, natürlichen Killerzellen und epithelialen Zellen exprimiert. Zusammengefasst werden sie unter dem Namen der pattern-recognition receptors (PRRs). Die Reaktion dieses Systems erfolgt viel schneller und kann das erworbene Immunsystem über costimulierende Moleküle wie CD80 und CD86 auf der Oberfläche von speziellen antigenpräsentierenden Zellen und dieselben Effektorzellen (z.B. dendritische Zellen) beeinflussen, was zusammen eine optimale Immunabwehr ergibt (Janeway 2002, Medzhitov 2000a, Ulevitch 2004).

1.5.1 Pattern Recognition Receptors (PRRs)

Das angeborene Immunsystem hantiert mit vielen verschiedenen Formen von pattern recognition receptors (PRRs), die auf der Zelloberfläche, in intrazellulären Kompartimenten exprimiert oder direkt ins Blut und Gewebeflüssigkeiten sezerniert werden können (Girardin 2002). PRRs sind keimbahn-kodierte Proteine und können nur eine bestimmte Art von Antigenen erkennen. Funktionell haben sie großen Anteil an Opsonisation, Komplement- und Koagulationsaktivierung, Phagozytose, Aktivierung von proinflammatorischen Signalkaskaden und Apoptoseinduktion (Medzhitov 2000a, b). Eine sehr wichtige Kategorie der PRRs bilden die Toll-like Rezeptoren (siehe 1.5.2) (Abreu 2005, Lien 2002, Medzhitov 2000c, Takeda 2003, 2004a). Die molekularen pathogenen Strukturen, die von den Rezeptoren erkannt werden, werden auch als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) bezeichnet. PAMPs sind mikrobielle Motive und Strukturen, die nur von Mikroorganismen produziert werden, innerhalb verschiedener mikrobieller Spezies nicht variieren, essentiell für das bakterielle Überleben sind und deshalb wenigen Mutationen ausgesetzt sind. Beispiele dafür sind Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Flagellin, doppelsträngige RNA und unmethylierte Cytidin-Phosphat-Guanosin (CpG) DNA (Medzhitov 2001). Nach der Bindung von PAMPs an PRRs kommt es zur Induktion endogener Signale, die entweder eine Entzündungsreaktion mit Produktion von IL-1, TNF- α , IL-6, Typ 1 – Interferonen und verschiedenen Chemokinen hervorrufen oder über Kostimulatoren T-Zellen aktivieren oder andere Effektorfunktionen einschließlich der Produktion von IL-4, 5, 10, 12, TGF- β und IFN- γ kontrollieren (Medzhitov 1997a, 2000, Murillo 2003).

Sezernierte pattern recognition Moleküle sind das Mannan-binding lectin (MBL), das C-reaktive Protein (CRP) und das Serum-Amyloid-Protein (SAP), die von der Leber während der akuten Phase Antwort im frühen Stadium der Infektion produziert werden (Schwalbe 1992). PRRs auf Oberflächen von Makrophagen wie z.B. macrophage mannose receptor (MMR) oder macrophage scavenger receptor (MSR) vermitteln die Phagozytose von Mikroorganismen und ihre Abgabe an die Lysosomen, wo sie zerstört werden (Fraser 1998). Viren und einige bakterielle Erreger können auch Zugang zu intrazellulären Kompartimenten gewinnen. Dafür werden mehrere PRRs wie die Proteinkinase PKR (Clemens 1997) oder die Familie der NOD-Proteine (Girardin 2003b, Inohara 2005) im Zytosol exprimiert, wo sie die sog. PAMPs erkennen und Antworten zur Beseitigung induzieren.

1.5.2 Die Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die Toll-like Rezeptoren sind PRRs, welche das Eindringen von Mikroorganismen wahrnehmen und antimikrobielle Antworten in Form von Entzündungen induzieren. Sie spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem und tragen viel zur intestinalen Homöostase bei (Rakoff-Nahoum 2004). Die Verwicklung der Toll-Rezeptoren in das angeborene Immunsystem wurde zuerst bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Belvin 1996). Ursprünglich wurde *Drosophila Toll* als ein transmembranöser Rezeptor identifiziert, der für die Entwicklung der dorso-ventralen Achsenformation während der Embryogenese dieser Fliege notwendig ist (Hashimoto 1988). Die Signalkaskade von *Drosophila Toll* und der IL-1 Pathway bei Säugetieren führen beide zur NF κ B-Aktivierung, was auf eine Mitbeteiligung von Toll an Immunantworten hindeutet. Daher untersuchte man den Toll-Pathway näher und fand heraus, dass er die Expression von antimykotischen Peptiden (Drosomycin) und Abwehr Gram-positiver Bakterien in erwachsenen Fliegen reguliert (Lemaitre 1996, Rutschmann 2002).

Später wurden mehrere homologe Korrelate zum *Drosophila Toll* bei Säugetieren identifiziert und als „Toll-like Rezeptoren“ bezeichnet. Insgesamt umfasst die Familie der „Toll-like Rezeptoren“ beim Menschen heute bisher 10 Mitglieder (Chaudhary 1998, Rock 1998, Takeuchi 1999, Chuang 2000, 2001, Du 2000, Kumagai 2008). Strukturell sind alle TLRs Typ I - Transmembranrezeptoren mit einer extrazellulären LRR-Domäne und einer signalweiterleitenden TIR (Toll/IL-1-Rezeptor)-Domäne im intrazellulären Abschnitt, welche große Analogie zur cytoplasmatischen Domäne von *Drosophila Toll* und IL-1-Rezeptor hat. Phylogenetisch kann die TLR-Familie noch einmal in fünf Untergruppen aufgeteilt werden (Abbildung 1.8). Alle TLRs werden auf immunkompetenten Zellen, darunter auch auf Enterozyten exprimiert und können damit potentiell eine Rolle in der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase und in der Entstehung von CED spielen (Cario 2005, Lasker 2006, Yuan 2004, Stenson 2008).

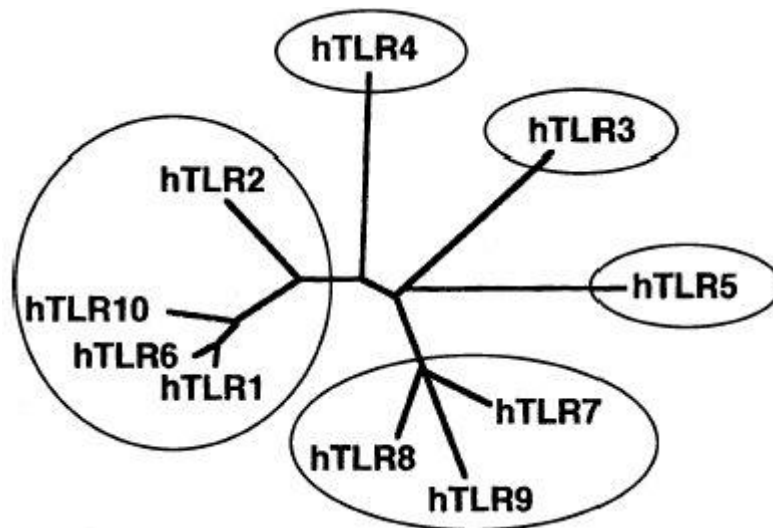


Abbildung 1.8 Phylogenie der Toll-like Rezeptoren (Takeda 2003)

TLR4 wurde als erster TLR beschrieben (Medzhitov 1997b). Das Gen für TLR4 ist auf dem Chromosom 9q32-33 lokalisiert. TLR4 ist ein essentieller Oberflächenrezeptor für bakterielles LPS (Hoshino 1999), erkennt aber auch andere Liganden. Als Hilfe für die Erkennung von LPS dienen das LPS binding protein (LBP), CD14 und MD-2. MD-2 ist direkt in die Ligandenbindung verwickelt, während LBP und CD14 die Ligandenpräsentation zu dem Rezeptorkomplex kontrollieren (Miyake 2006). TLR2, dessen Gen auf Chromosom 4q32 lokalisiert ist, erkennt viele verschiedene PAMPs wie Lipoproteine, Lipoteichonsäure oder Glykolipide. Die Gene für TLR1 und 6 haben ähnliche genomische Strukturen, bestehen aus einem Exon und sind auf demselben Chromosom 4p14 lokalisiert. Die spezifischen Liganden für TLR 1 und 6 sind Triacyl- und Diacyl- Lipopeptide. Beide Rezeptoren bilden mit TLR2 kooperativ Heterodimere und helfen bei der Bekämpfung von Mykobakterien, Borrellien oder Neisserien (Lien 1999). Das Gen für TLR5 ist auf dem Chromosom 1q33.3 lokalisiert und ist mit 5 Exons eines der größten Gene innerhalb seiner Familie. Die aktivierende Komponente für TLR5 ist Flagellin, Hauptbestandteil von bakteriellem Flagella und Baustein der Außenmembran Gram-negativer Bakterien (z.B. Salmonellen-Spezies) (Hayashi 2001). Doppelsträngige RNA (dsRNA) wird von vielen Viren während ihrer Replikationsphase produziert und wird spezifisch von TLR3 (Gen lokalisiert auf Chromosom 4q35, 5 Exons) erkannt (Alexopoulou 2001). Die Gene für TLR7 und 8 teilen sich den Genort Xp22 mit je zwei Exons. Der natürliche Ligand für TLR7 und 8 ist single-stranded RNA (ssRNA) von Viren wie HIV-1 oder Influenzavirus (Diebold 2004, Heil 2004). TLR7 erkennt noch die pharmazeutischen Komponenten Imiquimod und Resiquimod (Hemmi 2002, Takeda 2003). Das TLR10-Protein ist zu 50% identisch mit TLR1 und TLR6. Seine Funktion ist bisher noch

nicht geklärt (Murillo 2003). TLR1, TLR2, TLR6, TLR4 und TLR5 sind alle auf der zellulären Außenmembran lokalisiert. TLR3, TLR7 und TLR9 werden dagegen auf Membranen innerhalb der Zelle exprimiert (Akira 2004).

TLR	TLR-Liganden (Herkunft)
TLR1	Triacal-Lipopeptide (Bakterien, Mykobakterien)
TLR2	Lipoprotein/Lipopeptide (Bakterien) Peptidoglykane (Gram-positive Bakterien) Lipoteichonsäuren (Gram-positive Bakterien) Lipoarabinomannan (Mykobakterien) Glykolipide (<i>Treponema maltophilum</i>) Glykoinositolphospholipide (<i>Trypanosoma Cruzi</i>) Zymosan (Pilze) Atypisches LPS Hitzeschockproteine
TLR3	Doppelstrang-RNA (ds-RNA) (Viren)
TLR4	LPS (Gram-negative Bakterien) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) Virales F-Protein (RVS) Hitzeschockproteine
TLR5	Flagellin (Bakterien)
TLR6	Diacyl-Lipopeptide (Mykoplasmen)
TLR7/8	U-reiche einzelsträngige RNA (ssRNA)
TLR9	CpG-DNA (Bakterien)
TLR10	?

Tabelle 1.3 Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden (Harris 2006)

Die Aktivierung der TLRs führt zur Rekrutierung des Adapterproteins MyD88. MyD88 besteht aus einer N-terminalen death-Domäne und einer C-terminalen TIR-Domäne. Die TIR-Domäne vermittelt Interaktionen mit der TIR-Domäne von Toll und IL-1R, während die death-Domäne mit der death-Domäne der Interleukin-Rezeptor-assoziierten Kinase (IRAK), einer Serin/Threoninprotein-Kinase, interagiert. Daraufhin kommt es zur Aktivierung und Autophosphorylierung von IRAK. Es dissoziiert von MyD88 und assoziiert sich mit einem anderen Adapterprotein, TRAF6. TRAF6 gehört zur Familie der **TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren** und sorgt für die Aktivierung von TAK1 (transforming growth factor (TGF)- β -activated kinase) und MKK6 (mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 6). Am Ende der Signalkaskade steht dann aktives NF κ B, JNK (c-Jun N-terminal kinase) und p38MAP-Kinase (Akira 2003, O'Neill 2006). TAK1 führt durch Phosphorylierung zur Aktivierung von I κ B-Kinasen (IKKs), welche wiederum den NF κ B-Inhibitor I κ B phosphorylieren, und dadurch NF κ B freigesetzt wird. NF κ B wandert dann in den Zellkern antigenpräsentierender Zellen (z.B. dendritische Zellen) und induziert als Transkriptionsfaktor proinflammatorischer

Zytokine (z.B. IL-12) und die Expression kostimulierender Moleküle CD80 und CD86 zur T-Zellaktivierung (Abreu 2004, Aderem 2000, Medzhitov 2000b, Yuan 2004).

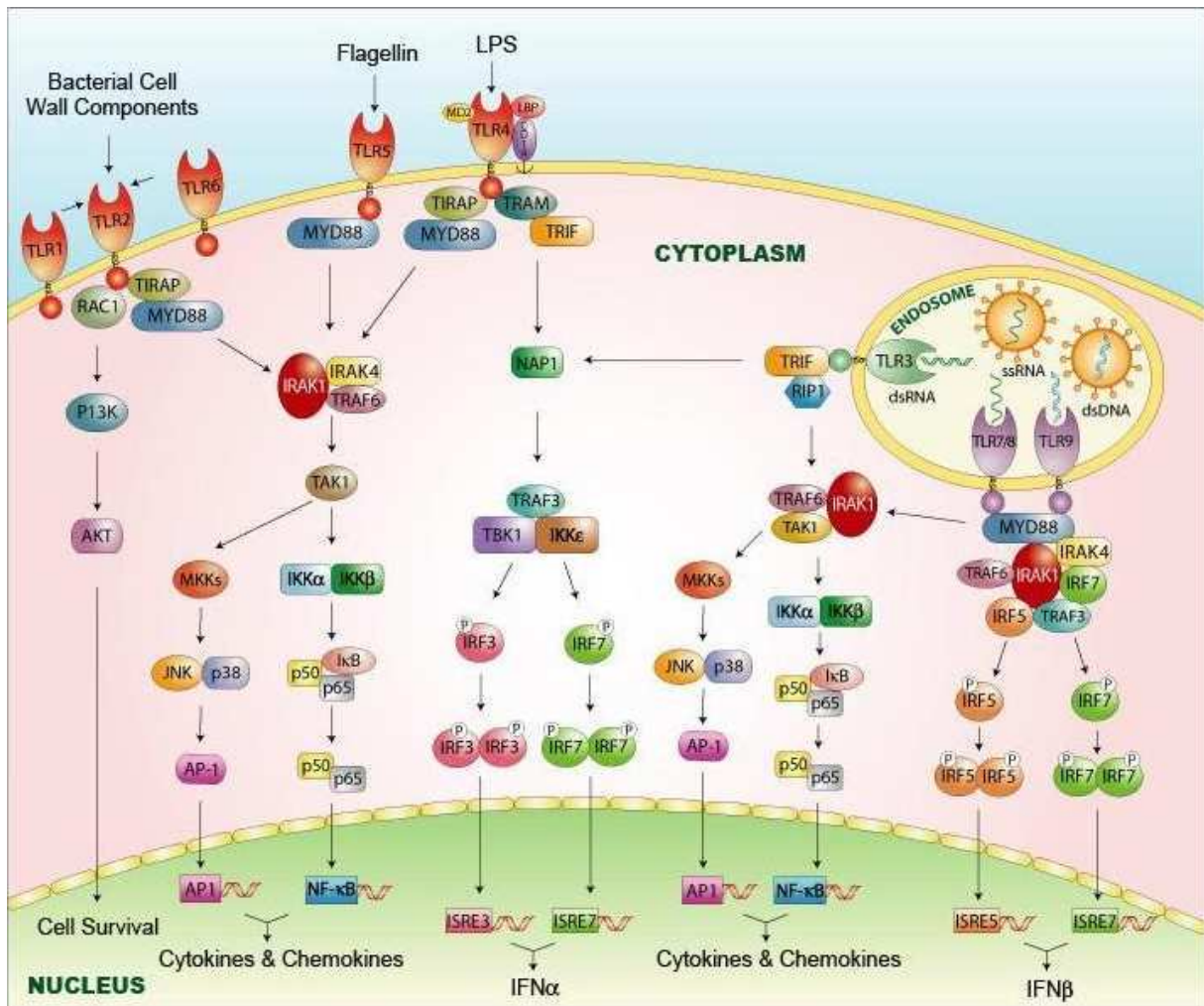


Abbildung 1.9 TLR-Signalkaskade

Die Bindung von TLR-Liganden an TLR aktiviert den MyD88-abhängigen oder unabhängigen Signalweg und führt zur Induktion inflammatorischer Zytokine (www.invivogen.com)

So kann das erworbene Immunsystem über TLRs des angeborenen Immunsystems aktiviert werden. Unreife dendritische Zellen (DCs) erkennen Pathogene durch TLRs und exprimieren daraufhin kostimulierende und MHC II – Moleküle. Nach Wanderung in Lymphknoten und andere Lymphorgane aktivieren die jetzt reifen DCs durch diese Moleküle und die Zytokinproduktion naive T-Zellen, welche sich in Th1- oder Th2 – Zellen differenzieren (Medzhitov 2001, Werling 2003, Takeda 2001) (Abbildung 1.10).

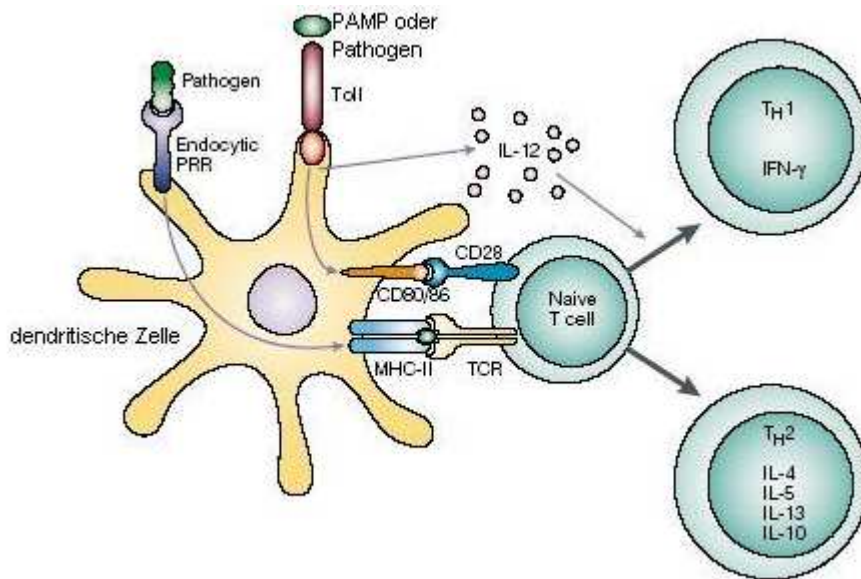


Abbildung 1.10 Die Rolle von TLR in der Aktivierung des erworbenen Immunsystems

Das Erkennen von PAMPs durch TLRs auf antigenpräsentierenden Zellen (z.B. dendritische Zellen) führt zur erhöhten Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80 und CD86), MHC Klasse II-Molekülen, Zytokinen wie IL-12, Chemokinen und ihren Rezeptoren und triggern dadurch die Reifung der dendritischen Zellen. Daraufhin können sich naive T-Zellen differenzieren und eine T-Zell-spezifische Immunantwort generieren (modifiziert nach Medzhitov 2001).

Für TLR4 und 3 existiert noch ein anderer Signalweg, der unabhängig von MyD88, aber noch nicht vollständig geklärt ist. Untersuchungen zeigten, dass MyD88-knockout Zellen trotzdem durch LPS und dsRNA stimuliert werden können. Die Adapterfunktion von MyD88 übernimmt dabei TRIF, das auch eine TIR-Domäne trägt. Über weitere Adaptermoleküle kommt es am Ende zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und IRF-3. IRF-3 induziert u.a. die IFN-β Produktion (Kaisho 2006, Oda 2006, Takeda 2004b). Um überschießende Reaktionen zu verhindern, gibt es das Toll-interacting protein (TOLLIP), welches die TLR-Signale hemmt und mit IRAK interagiert (Takeda 2003, Zhang 2002).

Da bei Patienten mit CED die T-Zellantworten gestört sind, sind auch TLRs ins Zentrum der CED-Forschung gerückt (Harris 2006, Yamamoto-Furusho 2007b). Es konnte gezeigt werden, dass bei Veränderungen in der Expression von TLRs, v.a. von TLR4 und TLR2, eine intestinale Entzündung hervorgerufen werden kann (Cario 2000, Hausmann 2002). Außerdem sind die TLR4-Polymorphismen Asp299Gly und Thr399Ile mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa assoziiert (Brand 2005, Browning 2007, Franchimont 2004, Gazouli 2005, Okayama 2002, Török 2004a, Zoniten-Mekki 2009). Erhöhte Titer von Flagellin-spezifischen Antikörpern im Serum von MC-Patienten geben Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von TLR5 in der Krankheitsentwicklung (Lodes 2004, Sitaraman 2005, Erridge 2010).

1.5.3 TLR 9

Die meisten TLRs sind auf der Zelloberfläche exprimiert. TLR9 und seine Gruppenmitglieder TLR7 und TLR8 dagegen scheinen ihre Funktion innerhalb der Zelle auszuüben. Es zeigte sich, dass TLR9 der Rezeptor für bakterielle DNA mit nicht-methylierten CpG-Sequenzen ist (Bauer 2001, 2002, Hacker 2000, Hemmi 2000). Im Genom von Vertebraten kommen solche Sequenzen nicht vor. Unmethylierte prokaryotische CpG DNA hat genauso wie synthetisch hergestellte unmethylierte CpG-Oligodeoxynukleotide (CpG ODN) starke immunstimulatorische Aktivität (Krieg 1995). Das optimalste CpG-Motiv zur Stimulierung menschlicher Zellen ist 5'-GTCGTT-3'. Eine Modifizierung des ODN-Rückgrats lässt eine Unterteilung in drei verschiedene Klassen von CpG ODN mit unterschiedlichen Zellantworten auf ihre Stimulation hin zu (Verthelyi 2003, Watson 2005). CpG-A ODN besitzt einen Mix aus Phosphodiester (PO) im Zentrum mit dem CpG-Motiv und Phosphorothioate (PS) am 5'- und 3'-Ende mit polyG-Motiven als Rückgrat. Stimuliert werden pDCs zur Produktion hoher Mengen an IFN α . Im Gegensatz dazu hat die zweite Klasse CpG-B ODN ausschließlich ein Rückgrat aus PS ohne polyG-Motive. Dieser ODN-Typ ist potenter Aktivator von B-Zellen und induziert NF κ B-Aktivierung, aber eine dürftige IFN α -Produktion von pDCs. Die dritte Klasse von ODN, CpG-C, ist charakterisiert durch ein PS-Rückgrat, aber keinen polyG-Motiven wie CpG-A ODN sondern einer GC-reichen Pallindromsequenz. Die CpG-C ODN Sequenzen induzieren effektiv Antworten wie CpG-A und CpG-B (Krieg 2002, Vollmer 2004). Wie die TLR9-Liganden von aussen nach innen kommen, ist noch unbekannt. Das scheint aber über rezeptorvermittelte Endozytose zu geschehen (Ulevitch 2004).

TLR9 ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Nach endozytischer Aufnahme von CpG DNA transloziert TLR9 über kleine Vesikel zum lysosomalen Kompartiment, wohin sein Ligand transportiert wird, und löst nach Bindung die Signalkaskade aus (Latz 2004, Leifer 2004). Exprimiert wird TLR9 v.a. in plasmazytoiden dendritischen Zellen und B-Zellen (Rothenfusser 2002), aber auch in Monozyten, epithelialen Zellen und Paneth Zellen (Hornung 2002, Kadowaki 2001, Krug 2001, Rumio 2004, Lee 2006). Immunstimulatorische Funktionen der CpG DNA-Motiven sind die Aktivierung und Reifung der DCs, die B-Zellproliferation, sowie die Produktion von IL-6 und 12 und anderen Zytokinen und Chemokinen. Eine Aktivierung von TLR9 in dendritischen Zellen führt zur IL-12-Produktion und im Endeffekt zu einer Th1-Antwort (Krieg 2000, Lipford 1998). Die Signalkaskade folgt nach dem MyD88-abhängigen Weg (Wagner 2002).

Die bakterielle Darmflora und das Immunsystem sind essentielle Risikofaktoren in der CED-Pathogenese. TLRs als Mitglieder des angeborenen Immunsystems und Rezeptoren für bakterielle Bestandteile sind maßgeblich an der intestinalen Homöostase mitverantwortlich (Cario 2005). TLR9 spielt eine wichtige Rolle in der Modulation von Darmerkrankungen. Eine bereits etablierte Kolitis exazerbiert unter Stimulierung mit CpG DNA (Obermeier 2002) und TLR9-defizient Mäuse zeigten nach Induktion einer Kolitis eine signifikant niedrigere Entzündung als Wildtyp-Mäuse (Obermeier 2005). Es ist auch bekannt, dass prophylaktisch verabreichte CpG DNA protektiv auf nachfolgend induzierte Koliden wirken. Die Schwere der Kolitis wird abgemildert und die Zytokin-vermittelte Entzündung begrenzt (Jijon 2004, Obermeier 2003, Rachmilewitz 2002). Dieser antiinflammatorische Effekt probiotischer Bakterien wird über TLR9 vermittelt (Rachmilewitz 2004). Des Weiteren ist TLR9 außer in immunologischen Zellen auch in Paneth Zellen exprimiert, die im Darm eine wichtige Rolle des MALT-Systems einnehmen. Die systemische Verabreichung von CpG DNA-Motiven führt zur Degranulation von Paneth Zellen und Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine (Rumio 2004). Wegen der vielen molekularen Bestandteile (PAMPs) eines mikrobiellen Pathogens sind zur effektiven Aktivierung des angeborenen Immunsystems in vivo komplexe Interaktionen unter den vielen verschiedenen PRRs notwendig. Einige funktionelle Studien haben bereits gezeigt, dass die Morbus Crohn-assoziierten Varianten von NOD2 die synergistischen Effekte von NOD2 mit anderen PRRs beeinträchtigen (van Heel 2005a, Traub 2004, Yang 2001). Van Heel und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die NOD2-Stimulation normalerweise die Immunantwort auf CpG DNA erhöht. Dieser synergistische Effekt zwischen NOD2 und TLR9 geht in Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen verloren (van Heel 2005b), was Interaktionen zwischen diesen zwei Rezeptoren mit möglichen Auswirkungen auf das intestinale Gleichgewicht nahe legt. Auch die Koexpression von TLR9 (Rumio 2004) und NOD2 (Lala 2003) eng zu den Sekretionsgranula im intrazellulären Kompartiment der Paneth Zellen lässt annehmen, dass doppelte Signale über NOD2 und TLR9 für eine effiziente bakterielle Bekämpfung im Darm notwendig sind.

Das TLR9-Gen ist auf Chromosom 3p21.3 lokalisiert (Chuang 2000, Du 2000), in der Nähe einer beschriebenen Kopplungsregion für CED (Duerr 2002, Hampe 2001a). Das gesamte Gen umfasst etwa 5 kb und besteht aus zwei Exons, von denen das zweite die hauptkodierende Region ist. Lazarus und seine Mitarbeiter analysierten das Gen nach Sequenzvariationen und identifizierten vier SNPs mit einer Frequenz von 15 % oder mehr in europäischen und afrikanischen Amerikanern (Lazarus 2003). Zwei von diesen SNPs, nämlich -1237 T/C und 2848 A/G, können die vier TLR9-Haupthaplotypen unterscheiden.

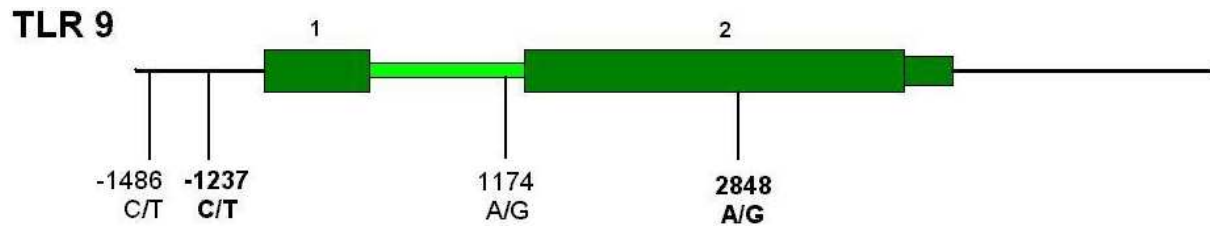


Abbildung 1.11 Struktur des TLR9-Gens und Lokalisation der vier SNP

Die Kästchen entsprechen den Exons (dunkelgrün) und Introns (hellgrün) (modifiziert nach Lazarus 2003)

Für den SNP TLR9 –1237C zeigte sich schon ein erhöhtes Risiko für chronische relapsing Pouchitis (Lammers 2005). Um eine mögliche genetische Assoziation von TLR9 mit CED zu erforschen, wurde bereits in unserer Arbeitsgruppe eine Fall-Kontroll-Pilotstudie durchgeführt, in der die zwei oben genannten Polymorphismen getestet wurden. Einen signifikanten Frequenzanstieg von –1237 C-Allel in Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen konnten beobachtet werden (Török 2004b).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Ätiologie der beiden Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa weist ein multifaktorielles Bild auf. Essentiellen Anteil an der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen haben Umwelteinflüsse, genetische Komponenten und das Immunsystem mit der bakteriellen Darmflora. Ein entscheidender Meilenstein in der genetischen Forschung ist die Entdeckung von NOD2-Mutationen als stärkster genetischer Risikofaktor für Morbus Crohn. Die beschriebene Assoziation lässt vermuten, dass auch andere Rezeptoren des angeborenen Immunsystems in der Entstehung der Erkrankung impliziert sein könnten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob TLR9 aufgrund genetischer Assoziationen mit in den Kreis der Suszeptibilitätsgene für chronisch entzündliche Darmerkrankungen aufgenommen werden kann. Dafür wurden der Promotorpolymorphismus –1237 T/C und der Polymorphismus 2848 A/G im TLR9-Gen untersucht. Zunächst wurden die beiden TLR9-Polymorphismen in einer erweiterten Population von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zu gesunden, unverwandten Kontrollpersonen untersucht. Es sollte untersucht werden, ob die beobachtete Assoziation mit Morbus Crohn aus der ursprünglichen Pilotstudie (Török 2004b) bestätigt werden kann. Des Weiteren sollten mögliche genetische Interaktionen zwischen diesen Varianten und den drei Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Mutationen untersucht werden. Hierzu wurden alle Patienten und Kontrollpersonen auf diese drei Varianten hin getestet und die Verteilung der TLR9-Polymorphismen in Abhängigkeit

vom NOD2-Genotyp ausgewertet. Es wurde weiterhin versucht, potentielle Korrelationen zwischen dem Genotyp und dem klinischen Phänotyp des einzelnen Krankheitsbildes hervorzuheben. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es funktionelle Daten zur Expression von TLR9 in der Darmmukosa von erkrankten und gesunden Individuen zu erheben. Hierzu wurde die Expression von TLR9 in der Darmmukosa bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich zu gesunden, unverwandten Kontrollpersonen gemessen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob Unterschiede in den Expressionsmustern von TLR9 in den verschiedenen Darmabschnitten bestehen, und ob der TLR9- bzw. NOD2-Genotyp einen Einfluss auf die TLR9-Expression in der Darmmukosa ausübt.

2. Material und Methoden

2.1 Studienpopulation

2.1.1 Studienpopulation für die Polymorphismenanalyse

Insgesamt wurden 1748 Personen in die Studie eingeschlossen. Davon waren 956 CED-Patienten (606 Patienten mit Morbus Crohn und 350 Patienten mit Colitis ulcerosa) und 792 gesunde, nicht verwandte Kontrollpersonen. Die in der originalen Pilotstudie untersuchte Population (Török 2004b) stellte sich aus 174 Morbus Crohn-Patienten und 138 Colitis ulcerosa-Patienten, die sich alle in ambulanter oder stationärer Behandlung in der Medizinischen Klinik bzw. medizinischen Poliklinik Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München befanden, und 265 Kontrollpersonen zusammen. Um das Ergebnis dieser ersten Studie zu bestätigen, wurden zwei weitere voneinander unabhängige Populationen untersucht. Die zweite Patientenpopulation stellte sich aus 287 mit Morbus Crohn und 110 mit Colitis ulcerosa, welche alle als in der Medizinischen Klinik II Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München betreut wurden, zusammen. Als dritte unabhängige Patientenpopulation wurden 145 Morbus Crohn- und 102 Colitis ulcerosa-Patienten vom Klinikum der Ruhr-Universität Bochum eingeschlossen. Außerdem wurden 527 gesunde Blutspender vom Blutspendedienst der Stadt München als Kontrollen in die Replikationsstudie eingeschlossen. Alle Daten der eingeschlossenen Individuen unterlagen strengster Vertraulichkeit und wurden für die Studie anonymisiert.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission genehmigt. Alle Individuen gaben vorher ihr schriftliches Einverständnis für die Entnahme der Blutproben und wurden über Inhalt und Ziele der Studien aufgeklärt. Zur Teilnahme an der Studie wurden nur Patienten mit gesicherter Diagnose eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa mittels klinischen, endoskopischen, histologischen und radiologischen Kriterien zugelassen (Nayar 2004, Viscido 2005, Stange 2006). Patienten mit einer Colitis indeterminata oder anderen unspezifischen Kolitiden wurden nicht in die Studie mit aufgenommen. Als Material wurde venös entnommenes EDTA-Vollblut verwendet. Alle Studienteilnehmer waren kaukasischer Herkunft. Signifikante Unterschiede in Hinblick auf demographische Charakteristika wurden zwischen

den verschiedenen Populationen nicht beobachtet. Die demographischen Daten sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Studiengruppe	Anzahl	Geschlechterverteilung männlich/weiblich (%)	Altersdurchschnitt \pm Standardabweichung	Altersverteilung
Kontrollpopulation 1 (Török 2004b)	265	141/124 (53,2/46,8)	42,2 \pm 12,5	18-68
Kontrollpopulation 2	529	355/174 (67,1/32,9)	47,5 \pm 9,2	35-68
CED Kohorte 1 (Török 2004b)				
Morbus Crohn	174	69/105 (39,7/60,3)	39,4 \pm 13,6	16-76
Colitis ulcerosa	138	68/70 (49,3/50,7)	41,9 \pm 13,1	17-76
CED Kohorte 2				
Morbus Crohn	291	127/164 (43,6/56,4)	40,5 \pm 12,6	15-75
Colitis ulcerosa	110	49/61 (44,5/55,4)	43,0 \pm 14,3	21-85
CED Kohorte 3*				
Morbus Crohn	145			
Colitis ulcerosa	102			

* für diese Kohorte waren demographische und klinisch phänotypische Daten nicht verfügbar

Tabelle 2.1 Demographische Daten der Patienten und Kontrollpersonen

2.1.2 Studienpopulation für die Expressionsanalyse

Für die Expressionsanalyse von TLR9-mRNA in der Darmmukosa wurden insgesamt 100 Personen untersucht. Zunächst sollte untersucht werden, ob unabhängig vom Aktivitäts-/Entzündungsstadium der Mukosa Unterschiede in der TLR9-mRNA-Expression zwischen CED-Patienten und Kontrollpersonen bestehen. Hierfür wurden 25 Patienten mit Morbus Crohn und 17 Patienten mit Colitis ulcerosa untersucht, bei denen es makroskopisch sowie mikroskopisch Hinweise für eine aktive Entzündung gab, und die alle in der Medizinischen Klinik bzw. medizinischen Poliklinik Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München behandelt wurden. Desweiteren sollte untersucht werden, ob bei Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa Unterschiede in der TLR9-mRNA-Expression in der Darmmukosa abhängig von der entzündlichen Aktivität vorliegen. Hierfür wurden 14 Morbus Crohn- und 12 Colitis ulcerosa-Patienten aus der Medizinischen Klinik Großhadern untersucht, bei denen Biopsien aus entzündeten und nicht entzündeten Darmarealen entnommen wurden, eingeschlossen. Diese wurden mit 32 Kontrollpersonen, die sich alle in der Me-

dizinischen Klinik bzw. medizinischen Poliklinik Innenstadt des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München einer Vorsorgekoloskopie unterzogen, verglichen.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission genehmigt. Alle teilnehmenden Personen wurden über Inhalt und Ziele der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Entnahme der Gewebeprobe. Zur Teilnahme an der Studie wurden nur Patienten mit gesicherter Diagnose eines Morbus Crohn oder einer Colitis ulcerosa mittels klinischen, endoskopischen, histologischen und radiologischen Kriterien zugelassen. Als Material wurden endoskopisch gewonnene Biopsate der Darmmukosa aus den Darmabschnitten des terminalen Ileum, der rechten und linken Kolonhemisphäre verwendet. Alle Studienteilnehmer waren kaukasischer Herkunft. Signifikante Unterschiede in Hinblick auf demographische und ethnische Strukturen wurden zwischen den verschiedenen Populationen nicht beobachtet. Die demographischen Daten sind in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa	Kontrollpersonen
Anzahl	39	29	32
Altersdurchschnitt ± Standardabweichung	40,7 ± 13,28	49,7 ± 15,0	47 ± 16,3
Altersverteilung	21-71	16-71	21-73
Geschlechterverteilung männlich/weiblich (%)	20/19 (51,3/48,7)	21/8 (72,4/27,6)	16/16 (50,0/50,0)

Tabelle 2.2 Demographische Daten aller Patienten und Kontrollpersonen in der Expressionsanalyse

2.2 Phänotypische Daten der CED-Patienten

Die Klassifizierung des Phänotyps des Morbus Crohn basiert auf dem Alter bei Krankheitsbeginn, Lokalisation bzw. maximalen Ausmaß der Krankheit und Krankheitsverhalten entsprechend der Vienna-Klassifikation (Gaschè 2000) bzw. der Montreal-Klassifikation (Satsangi 2006). Bzgl. des Ausmaßes der Erkrankung erfolgte die Unterteilung in die Gruppen L1 (Befall des Ileums), L2 (Befall des Kolons), L3 (Befall des Ileums und Kolons) und L4 (Befall des oberen Gastrointestinaltrakts). Wenn der obere Gastrointestinaltrakt und ein Darmabschnitt zugleich beteiligt waren, wurden die Patienten in L1-L3 eingeordnet. L4 beinhaltet nur das isolierte Befallsmuster des oberen Gastrointestinaltrakts.

Bzgl. des Krankheitsverhaltens erfolgte die Einteilung in B1 (inflammatorischer Subtyp), B2 (stenosierender Subtyp) und B3 (fistulierender Subtyp). Dabei ist der stenosierende Subtyp durch das Vorhandensein von persistierenden Lumenverengungen definiert, welche radiologisch, endoskopisch oder pathologisch nach Operationen bestätigt worden sind. Der fistulierende Subtyp ist durch das Bestehen von abdominellen oder perianalen Fisteln während des Krankheitsverlaufs determiniert. Der inflammatorische Subtyp ist dadurch charakterisiert, dass niemals Stenosen oder Fisteln auftraten. Viele Patienten wiesen sowohl Fisteln als auch Stenosen auf und wurden entsprechend analysiert.

Für das Alter bei Erstdiagnose wurde die Montreal-Klassifikation verwendet, welche die Kategorien „16 Jahre und jünger“ (A1), „17 bis 40 Jahre“ (A2) und „älter als 40 Jahre“ (A3) beinhaltet (Satsangi 2006).

Zusätzlich wurde noch die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention während des Krankheitsverlaufs ausgewertet.

Für die Klassifizierung des Befallsmusters der Colitis ulcerosa wurde ebenfalls die Montreal-Klassifizierung eingesetzt (Satsangi 2006).

Ausführliche klinische Daten konnten insgesamt von 443 Morbus Crohn und 203 Colitis ulcerosa-Patienten eruiert werden. Die phänotypischen Details wurden durch eine standardisierte retrospektive Analyse der medizinischen Akten gewonnen.

Alle phänotypischen Daten sind in der Tabelle 2.3 zusammengefasst.

	Anzahl der bewerteten Fälle
Alter bei Erstdiagnose Morbus Crohn (Montreal A)	
A1 bis 16 Jahre	48/429 (11,2%)
A2 zwischen 17 und 40 Jahre	324/429 (75,5%)
A3 über 40 Jahre	57/429 (13,3%)
Lokalisation des Morbus Crohn (Montreal L)	
L1 Ileum	58/443 (13,1%)
L2 Kolon	76/443 (17,2%)
L3 Ileum und Kolon	307/443 (69,3%)
L4 isoliert oberer Gastrointestinaltrakt	2/443 (0,4%)
oberer Gastrointestinaltrakt insgesamt	51/443 (11,5%)
Krankheitsverhalten des Morbus Crohn (Vienna B)	
B1 inflammatorischer Subtyp	96/441 (21,8%)
B2 stenosierender Subtyp	111/441 (25,2%)
B3 fistulierender Subtyp	234/441 (53,0%)
Fisteln allgemein	234/441 (53,0%)
Stenosen allgemein	282/441 (63,9%)
Chirurgische Interventionen bei Morbus Crohn	222/432 (51,4%)
Lokalisation der Colitis ulcerosa (Montreal E)	
E1 ulcerative Proktitis	33/203 (16,3%)
E2 linksseitige Kolitis	66/203 (32,5%)
E3 Pankolitis	104/203 (51,2%)

Tabelle 2.3 Phänotypische Charakterisierung der CED-Patienten

2.3 DNA-Isolierung aus Blutleukozyten und aus Darmbiopsien

2.3.1 Material

- QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit (Qiagen): QIAamp spin columns
2 ml collection tubes
Buffer AL
Buffer AW1
Buffer AW2
Buffer AE
QIAGEN Protease
- DNeasy[®] Tissue Kit (Qiagen): Dneasy mini spin columns
2 ml collection tubes

Buffer ATL
Buffer AL
Buffer AW1
Buffer AW2
Proteinase K

- RNAlater (Qiagen)
- Ethanol 96-100 %, unvergällt (Merck)
- Isopropylalkohol (Merck)
- Proteinase K (Qiagen)
- Ery-Lyse-Puffer: 155 mM NH₄Cl
400 mM NaCl
1 mM EDTA
- Kernlyse-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH8
400 mM NaCl
10 mM EDTA
- gesättigte Natriumchloridlösung 5 M NaCl
- Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20 %
- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH8
1 mM EDTA

2.3.2 Methode

Die Isolierung von DNA aus Blutzellen erfolgte entweder mit Hilfe der Aussalzmethode (Miller 1988) oder einem handelsüblichen Kit (QIAamp[®] DNA Blood Mini Kit, Qiagen). Aus Darmbiopsien wurde die DNA nur mittels eines im Handel käuflichen Kits isoliert (DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen).

DNA-Isolierung mit Hilfe der Aussalzmethode

Das Blut wurde mit einem EDTA-Röhrchen entnommen (S-Monovette[®] 9 ml EDTA, Sarstedt). Noch am selben Tag wurden die Blutproben bei 2000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und bei -20°C zur weiteren Lagerung eingefroren. Das Sediment wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) mit 15 ml hypotonem Ery-Lyse-Puffer zur Erythrozyteneliminierung resuspendiert und bis zur kompletten Ly-

se der Erythrozyten ungefähr 10-15 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Rotator (Bachofer) inkubiert. Anschließend wurde zur Gewinnung der Leukozyten die Lösung bei 2000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Leukozytensediment nochmals mit Ery-Lyse-Puffer gewaschen und bei 5000 Upm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das gereinigte Leukozytensediment in 6 ml Kernlysepuffer resuspendiert. Zur Degradation der Membran- und Proteinanteile wurden 300 µl SDS-Lösung und 40 µl Proteinase K zugefügt. Danach wurde das ganze Gemisch über Nacht bei 37°C inkubiert und immer wieder auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Die DNA sollte vollständig gelöst sein und nicht als geleeartiges Aggregat vorliegen. Gegebenenfalls musste mehr Kernlysepuffer hinzugegeben und die Inkubationszeit verlängert werden. Zur Fällung der Protein- und Membranfragmente wurde $\frac{1}{3}$ Volumen 5 M NaCl-Lösung zugegeben, kräftig gemixt und bei 4°C oder auf Eis mindestens 30 Minuten inkubiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 3600 Upm wurde der Überstand abpipettiert und in einem neuen Röhrchen nochmals 15 Minuten bei 3600 Upm zentrifugiert. Das Protein-Pellet konnte verworfen werden. Der Überstand wurde wieder abpipettiert, in einem neuen Röhrchen mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und langsam gemischt. Die fadenförmig ausgefallene DNA wurde mit einer Pipettenspitze herausgefischt und zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde die DNA zur Trocknung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die getrocknete DNA wurde dann je nach Menge in etwa 200 µl TE-Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

DNA-Isolierung mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Qiagen

In den ersten Schritten wurden die Blutproben genauso wie in der Aussalzmethode behandelt, bis der reine Buffycoat (Leukozytensediment) gewonnen war. 200 µl Buffycoat wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) gelöst. Zu der Probe wurden 200 µl des Lysepuffers AL hinzugefügt und auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Nach 10minütiger Inkubation bei 56°C im Wasserbad und kurzer Zentrifugation wurden 200 µl 96-100 % Ethanol zugegeben, gut gemischt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurde das ganze Gemisch auf eine QIAamp Säule mit einem 2 ml Sammelgefäß pipettiert und bei 8000 Upm für 1 Minute zentrifugiert. Die DNA bindet dabei an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Das 2 ml Sammelgefäß wurde gegen ein neues ausgetauscht und das Filtrat verworfen. Als ersten Waschvorgang wurden 500 µl AW1-Waschpuffer auf die Membran der Säule pipettiert und alles nochmals bei 8000 Upm für 1 Minute zentrifugiert. Das 2 ml collection tube wurde wieder mit dem Durchfluss verworfen und ein neues verwendet. Der zweite Waschschrift bestand aus Zugabe von 500 µl AW2-Waschpuffer und nachfolgender Zentrifugation bei 14000

Upm für 3 Minuten. Zur Gewinnung der DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 200 µl AE-Elutionspuffer daraufgegeben. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und dann 1minütiger Zentrifugation bei 8000 Upm konnte die DNA aus der Matrix gewonnen und bei –20°C aufbewahrt werden.

DNA-Isolierung mit Hilfe des DNeasy[®] Tissue Kit, Qiagen

Die Darmbiopsien wurden im Rahmen einer im Klinikum durchgeführten Koloskopie entnommen. Für Lagerung und Transport wurden sie in RNAlater eingelegt und kühl gelagert. Zu Beginn der Isolation wurde jede einzelne Probe gewogen. Für diese Methode darf die Biopsie höchstens ein Gewicht von 25 mg haben. Anschließend wurde das Gewebestück in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 180 µl des Gewebelysepuffers ATL versetzt. Gemischt mit 20 µl Proteinase K wurde alles bei 55°C in einem Thermomixer bis zur kompletten Lyse inkubiert. Nach kurzem Vortexen wurden 200 µl AL-Lysepuffer hinzugefügt und nochmals für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurde alles noch mit 200 µl 96-100 % Ethanol vermischt, auf eine DNeasy Mini Säule mit einem 2 ml Sammelgefäß pipettiert und bei 8000 Upm für 1 Minute zentrifugiert. Während dem Durchlauf bindet die DNA an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Das collection tube konnte zusammen mit dem Filtrat verworfen und gegen ein neues ausgetauscht werden. Die nächsten zwei Schritte beinhalten die beiden Waschvorgänge. Als erstes wurden 500 µl AW1-Waschpuffer auf die Membran der Säule gegeben und bei 8000 Upm für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchlauf mit dem Sammelgefäß wurde wieder verworfen und ein neues verwendet. Als zweites wurden 500 µl AW2-Waschpuffer auf die Membran der Säule gegeben und anschließend für 3 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Um die DNA von der Membran zu lösen, wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und 200 µl AE-Elutionspuffer auf die Membran pipettiert. Durch 1minütige Zentrifugation bei 8000 Upm konnte die DNA in dem Reaktionsgefäß aufgefangen und dann bei –20°C gelagert werden.

2.4 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

2.4.1 Material

- Küvetten (Eppendorf)
- TE-Puffer

- RNase freies Wasser
- Photometer (Eppendorf)

2.4.2 Methode

Die Konzentrationen der Nucleinsäuren DNA und RNA werden photometrisch bestimmt. Das Absorptionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge (λ) von 260 nm, während Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm zeigen. Der Reinheitsgrad von DNA und RNA lässt sich als Quotient der beiden Extinktionen (OD_{260}/OD_{280}) beschreiben. Für DNA sollte der Extinktionsquotient mindestens 1,8 und für RNA 2,0 betragen. Die physikalische Grundlage der Konzentrationsberechnung bildet das Lambert-Beer'sche Gesetz: $C = OD_{260} \times f / (\epsilon \times d)$ [C: Konzentration (ng/ μ l), OD_{260} : Extinktion bei 260 nm, f: Verdünnungsfaktor, ϵ : Extinktionskoeffizient (dsDNA = $50^{-1}\mu$ l/ng, RNA = $40^{-1}\mu$ l/ng), d: Schichtdicke (1 cm)]. Als Eichprobe diente jeweils die bei Isolation verwendete Elutionslösung, d.h. bei DNA TE-Puffer und bei RNA RNase-freies Wasser. Bei DNA-Messungen wurden Verdünnungen von 1:20 bis 1:200 verwendet. Für die PCR wurde die DNA-Konzentration auf 100 ng/ μ l mit Zugabe von TE-Puffer eingestellt.

2.5 Die PCR (polymerase chain reaction)

2.5.1 Material

- Aqua ad injectabilia (Braun)
- 10x PCR-Puffer (Qiagen): Tris-HCl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$, pH 8.7 bei 20 °C
- Deoxynucleotid-Mix (dNTP) mit je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Sigma)
- HotStarTaq™ DNA-Polymerase (Qiagen)
- Oligonukleotide (TIB-MOLBIOL, Berlin)
- PCR-Thermocycler (DNA Engine DYAD™, Peltier Thermal Cycler, MJ Research)

	Primersequenz (5' → 3')
TLR9-1237-F	5'-CAGGAGTGCCAGATCTGGGGTGG-3'
TLR9-1237-R	5'-TTCTCCTGCCTCAGGGCCTTGG-3'
TLR9-2848-F	5'-CCACGAGCACTCATT <u>CACGGAGCTAT</u> C-3'
TLR9-2848-R	5'-TGTTGTTGTGGGCCAGGCTG-3'

Tabelle 2.4 **Primersequenzen für die Typisierung der TLR9-Polymorphismen**
 Die unterstrichenen Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz und dienen dem Einbau des Erkennungsmotivs für das verwendete Restriktionsenzym oder zur Eliminierung eines im Bereich der Primerbindungsstelle zusätzlich vorhandenen Erkennungsmotivs.

2.5.2 Methode

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) macht es möglich, ausgehend von einer kleinen Menge der gesamten genomischen DNA eine große Anzahl an Kopien eines einzelnen Sequenzabschnittes davon herzustellen. Voraussetzung dafür sind das Vorhandensein der passenden Primer und einer hitzestabilen DNA-Polymerase zur Amplifizierung. Die Primer bestehen aus einer Reihe von Oligonukleotiden in der Größe von 18-35 Basen und müssen jeweils zu einem DNA-Strang komplementär sein. Sie müssen so ausgewählt werden, dass sich die gewünschte Amplifikationssequenz zwischen den beiden Primern befindet (siehe Abb2.1). Der gesamte PCR-Zyklus besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Primer-Annealing und Extension, die solange wiederholt werden, bis die Kopienanzahl zum Nachweis der gewünschten Sequenz ausreicht. Am Anfang des PCR-Zyklus steht eine einmalige Denaturierung bei 95°C für 5-15 Minuten. Dabei lösen sich die beiden DNA-Stränge voneinander und der zweite Schritt das „Primer-Annealing“ kann beginnen. Bei für sie optimaler Temperatur (60/66°C) lagern sich die Primer gemäß ihrer Sequenz an ihren komplementären DNA-Strang an. Dieser Schritt hält nur 30 Sekunden an. Danach kann die DNA-Polymerase während der Extensionsphase bei einer Temperatur von 72°C den weiteren Abschnitt für >30 Sekunden (abhängig von der Produktlänge) amplifizieren. Anschließend beginnt der Zyklus von neuem mit der Denaturierungsphase. Allerdings reichen dafür schon 30 Sekunden bei 94°C aus. Der gesamte Zyklus wird ungefähr 35mal wiederholt. Am Ende steht noch einmal eine Endextension für 10 Minuten bei 72°C, währenddessen noch nicht komplett amplifizierte PCR-Produkte vervollständigt werden sollen.

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	95°C	15 min	1x
Denaturierung	94°C	30 sec	35x
Primer-Annealing	60/66°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Endextension	72°C	10 min	1x

Tabelle 2.5 PCR-Zyklus

Für eine optimale PCR werden noch weitere Komponenten wie schon oben erwähnt benötigt. Der PCR-Ansatz enthält 1 x PCR-Puffer, 0,2 mM Deoxynukleotid-Mix aus den vier verschiedenen Deoxynukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 0,25 µM der beiden sequenzspezifischen Primer, 0,025 U/µl HotStarTaq DNA-Polymerase, 1,5-3 mM MgCl₂-Lösung zur optimalen Mg²⁺-Konzentration, welche vorher ausgetestet wurde, steriles Wasser zur Einstellung des Gesamtvolumens von 10 µl und 5 ng/µl DNA-Probe. Zu jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativkontrolle ohne DNA mitgeführt. Am Ende wurden für die Genotypisierung Amplifikate einer Länge von 121-169 bp hergestellt, welche gekühlt gelagert wurden. Für alle Polymorphismen waren positive Kontrollen aller möglicher Genotypen vorhanden, welche durch Sequenzierung bestätigt worden waren und bei jeder PCR mitgeführt wurden (Török 2004a,b).

Die Annealing-Temperatur für die Primer wurde anhand der Schmelztemperaturen der Oligonukleotide berechnet (i.d.R. 5-7°C unter der Schmelztemperatur). Die optimale Temperatur zur Anlagerung wurde dann durch Austestung von mindestens drei verschiedenen Temperaturen (50-68°C) ermittelt.

Polymorphismus	Produktlänge	Annealing-Temperatur	MgCl₂-Konzentration
TLR9 -T1237C	132 bp	66°C	1,5 mM
TLR9 A2848G (Pro545Pro)	152 bp	60°C	1,5 mM

Tabelle 2.6 PCR-Bedingungen und Endproduktlängen

Die Auswahl der PCR-Primer wurde anhand der im National Center for Biotechnology Informations (NCBI) veröffentlichten Gensequenzen getroffen. In manchen Fällen mussten Abweichungen einzelner Basen von der Originalsequenz für den Einbau einer Erkennungsstelle eines bestimmten Restriktionsenzym vorgenommen werden.

Im TLR9-Gen wurden die zwei Polymorphismen –T1237C und A2848G untersucht. Beides sind Punktmutationen, wobei –T1237C in der Promotorregion liegt und A2848G im Exon 2. Für die Typisierung wurden die Primer so ausgewählt, dass sich der jeweilige Polymorphismus und eine entsprechende Erkennungssequenz des passenden Restriktionsenzym innerhalb des PCR-Produktes befindet. Im Falle von –T1237C wurden die 168 bp langen Amplifikate im Anschluss mit BstN I (CC[▼]A/TGG) verdaut. Nur bei Vorhandensein des C- und nicht des T-Allels wurde das PCR-Amplifikat in zwei Fragmente (125 bp + 43 bp) geschnitten. Damit das 152 bp lange Amplifikat von A2848G durch das Restriktionsenzym Nru I verdaut werden konnte, wurde über die Primersequenz durch Einbau einer Base eine vollständige Erkennungssequenz (TCG[▼]CGA) für das Restriktionsenzym hergestellt. Auch hier wurde nur bei Vorhandensein des G-Allels (2848G) und nicht des A-Allels (2848A) das PCR-Produkt in zwei Fragmente (124 bp + 28 bp) geschnitten.

-T1237C:

5' -caggagtgccagatctgggggtgggaggtttgtaagaaggctggatggcctggtgagag
ggtgacatgggagcagagacataatggaggcaaaggaggggtcatatgagacttgggg-
gagttt/ccaggcagaggggaacagcacatcccaaggcctgagggcaggagaa-3'

A2848G = Pro545Pro:

5' -ccacgagcactcattcacggagctatca/gcgactggaggcctggacctcagctacaa
cagccagccctttggcatgcagggcgtgggccacaacttcagcttcgtggctcac-
ctgcgcaccctgcgccacctcagcctggcccaacaaca-3'

Abbildung 2.1 PCR-Amplifikate für die Typisierung der TLR9-Polymorphismen

Der SNP ist rot hervorgehoben. Die Primersequenzen sind blau markiert. Die unterstrichenen Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz und wurden ausgetauscht, um eine vollständige Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym einzubauen.

Im NOD2-Gen wurden die drei mit MC-assoziierten Polymorphismen C2104T, G2722C und 3020insC untersucht. Bei C2104T und G2722C handelt es sich um eine Punktmutation an Position 2104 im Exon 4 bzw. 2722 im Exon 8 des Gens, während 3020insC eine Cytosinininsertion an Position 3020 im Exon 11 ist. Die Bestimmung der einzelnen Genotypen der Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten wurde bereits in einer vorausgegangenen Arbeit durchgeführt (Török 2004a).

Die Genotypisierung der Kontrollpopulationen bzgl. der 3 NOD2-Varianten wurde mit der Hybridisierungs-sondenmethode auf dem LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt (siehe 2.8).

2.6 Restriktionsverdau

2.6.1 Material

- Aqua ad injectabilia (Braun)
- Restriktionsenzyme (New England BioLabs):
 - BstN I: Erkennungssequenz 5'...CC▼A/TGG...3'
3'...GGT/A▲CC...5'
 - Nru I: Erkennungssequenz 5'...TCG▼CGA...3'
3'...AGC▲GCT...5'
- Restriktionspuffer (New England BioLabs):
 - 1x NEBuffer 2: 50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1mM Dithiothreitol
pH 7,9 bei 25°C
 - 1x NEBuffer Nru I: 100 mM KCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
pH 7,7 bei 25°C
- BSA 100 x (10 mg/ml) (New England BioLabs)
- Ofen (Thermo electron corporation)

2.6.2 Methode

Um die Genotypisierung der einzelnen Polymorphismen möglich zu machen, wurden die PCR-Amplifikate mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut. Dabei wurden Endonukleasen verwendet, die von Bakterien synthetisiert werden. Sie können spezifische DNA-Sequenzen erkennen und schneiden. Für jeden Polymorphismus wurde ein bestimmtes Restriktionsenzym ausgesucht, welches das PCR-Amplifikat so schneidet, dass später die Fragmente den Nachweis des Polymorphismus erbringen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine weitere Erkennungssequenz in dem Amplifikat enthalten ist. Wenn keine komplette Erkennungssequenz vorhanden ist, so kann diese in der PCR durch eine in einzelnen Nukleotiden von der Originalsequenz abweichende Primersequenz eingefügt werden. Der Restriktionsansatz für 10 µl PCR-Produkt enthält 1,25 µl 10x Restriktionspuffer, 7,5 U/µl Restriktionsenzym, 0,125 µl 100x bovines Serumalbumin (BSA) und 0,375-0,5 µl Wasser zur Einstellung des Gesamtvolumens von 2,5 µl. Insgesamt wurde der Restriktionsansatz über Nacht (mindestens zwei Stunden) für den Verdau der DNA bei einer für das Enzym spezifischen Temperatur inkubiert.

Polymorphismus	Enzym	Enzymkonzentration	Restriktionspuffer	BSA	Temperatur	Fragmentlängen
TLR9 –T1237C	BstN I (10 U/µl)	0,4 U/µl	NEBuffer 2	ja	60°C	Allel C: 125 + 43 bp Allel T: 168 bp
TLR9 A2848G (Pro545Pro)	Nru I (10 U/µl)	0,4 U/µl	NEBuffer Nru I	nein	37°C	Allel G: 124 + 28 bp Allel A: 152 bp

Tabelle 2.7 Restriktionsenzyme und -bedingungen

2.7 Agarosegelelektrophorese

2.7.1 Material

- Agarose Typ I-A (Sigma)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- 10x TBE-Puffer: 890 mM Tris

890 mM **Borsäure**

20 mM **EDTA**

pH 8

- DNA-Auftragspuffer:
 - 10 mM Tris/HCl pH 8
 - 2 mM EDTA
 - 20 % Ficoll 400
 - 0,25 % Orange G
 - 6x DNA loading buffer (Cambrex): 15 % Ficoll 400
 - 0,06 % Bromophenol Blau
 - 0,06 % Xylene Cyanol FF
 - 30 mM EDTA
- 100 bp DNA Molekulargrößenstandard (Cambrex, Biozym Scientific GmbH)
- Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad, Sub-Cell[®]GT)
- Spannungsgerät (Bio-Rad, PowerPac 3000)
- Fotopapier (Polaroid)
- UV-Kamera (Peqlab Biotechnologie GmbH)
- Foto-Software (InfinityCapt)

2.7.2 Methode

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, die Ergebnisse der PCR und des Restriktionsverdauens sichtbar zu machen. Die DNA-Fragmente werden der Größe nach in einem elektrischen Feld, das durch eine an die Elektrophoresekammer angelegte Spannungsquelle erzeugt wird, aufgetrennt. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Agarosegel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt, hin zur positiv geladenen Anode des Spannungsfeldes. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Molekülgröße, wobei kleinere Fragmente schneller wandern als größere. Bei jedem Lauf wird ein Molekulargewichtsstandard mitgeführt, um die Größe der Fragmente abschätzen zu können. Da die Fragmente unter 200 bp groß waren, wurden Agarosekonzentrationen von 2,5 % verwendet. Die Agarose wurde in 250 ml 1x TBE-Puffer mittels Erhitzen in der Mikrowelle aufgelöst. Die verdunstete Flüssigkeit wurde ersetzt und 4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das noch flüssige Gel wurde in einen 15 x 25 cm großen Gelträger gegossen, in den vier Gelkämme mit jeweils 20 Zähnen

eingesetzt waren. Nach einer halben Stunde Trocknungszeit wurden die Gelkämme aus dem erstarrten Gel gezogen und das Gel in die mit Laufpuffer (1x TBE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die verdauten DNA-Proben wurden mit ¼ Volumen Auftragspuffer versetzt und jede Geltasche mit je 15 µl einer Probe beladen. In der ersten Tasche jeder Reihe wurde ein 100 bp-Leiter (4 µl Orange G + 2 µl Leiter (400 ng DNA) + 14 µl Wasser oder 2,5 µl 6x Loading Buffer + 1,6 µl Leiter (160 ng DNA) + 10,9 µl Wasser) als Größenstandard mitgeführt. Bei einer Spannung von 120 Volt dauerte die Laufzeit insgesamt 1,5 bis 2 Stunden. Da der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zwischen die Basen der DNA interkaliert und somit die einzelnen Fragmente im UV-Licht sichtbar macht, wurde das Gel anschließend mit dem UV-Transilluminator betrachtet und mit einer Kamera fotografiert.

2.8 Genotypisierung mittels Hybridisierungssondenmethode

2.8.1 Material

- LightCycler 480 Genotyping Master (Roche)
- Primer, Sensor-, Ankersonden (TIB Molbiol)
- Multiwell Platte 480 (Roche)
- Sealing Foil (Roche)
- Sterile 1,5 Eppendorf-Tubes
- RNase free water
- Zentrifuge

	NOD2 Ex4 C2104T (Arg702Trp) C>T
Ankersonde	5'-LCRed640-GTCTGGCACTCAGCCAGCAGGCCCC-3'
Sensorsonde	5'-GCGCCAGAGCAGGGCCTTCTCA-FL-3'
Primer forward	5'-AGCCGCACAACCTTCAGATCAC-3'
Primer revers	5'-GCGGGCACAGGCATAGC-3'

	NOD2 Ex8 G2722C (Gly908Arg) G>C
Ankersonde	5'-LCRed640-CTGAAAAGGCCAAAAGAGTCAACAGAC-3'
Sensorsonde	5'-CCACTCTGTTGCG <u>C</u> CCAGAA-FL-3'
Primer forward	5'-GCACATATCAGGTACTCACTGACACT-3'
Primer revers	5'-TTACCTGAGCCACCTCAAGC-3'

	NOD2 Ex11 3020insC (Leu1007fsinsC)
Ankersonde	5'-LCRed640-CCATCCTGGAAGTCTGGTAAGGCC-3'
Sensorsonde	5'-AGGCC <u>C</u> CTTCAAAGGAATGAC-FL-3'
Primer forward	5'-TCTTCTTTTCCAGGTTGTCCAA-3'
Primer revers	5'-TGAGGTTTCGGAGAGCTAAAACAG-3'

Tabelle 2.8 Sonden- und Primersequenzen für die einzelnen NOD2-Polymorphismen
Die unterstrichenen Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz. Die Ankersonden sind jeweils mit LCRed640 und die Sensorsonden jeweils mit Fluorescein markiert.

2.8.2 Methode

Das Prinzip dieser Methode ist die Schmelzpunktbestimmung durch Schmelzkurvenanalyse unter Verwendung von Hybridisierungssonden nach dem Grundsatz des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET).

Hybridisierungssonden bestehen aus einem Paar Oligonukleotiden, die benachbart hybridisieren können. Sie tragen an den aufeinander zu gerichteten Enden zwei Fluophore, die über Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer miteinander interagieren können. Dabei überträgt der kurzwelligere Farbstoff Fluorescein, der mittels blauem Licht angeregt wird, seine Energie strahlungslos an den langwelligeren Farbstoff LightCycler[®] Red. Dieser gibt ein rotes Licht ab, das detektiert wird. Das Signal kommt also nur zustande, wenn beide Sonden in räumlicher Nähe binden. Die Signalfluoreszenz ist proportional zur Menge der vorliegenden Zielsequenz. Die hybridisierende Bindung zwischen den Sonden ist reversibel. Die Bindungsstärke berechnet sich in thermodynamischen Größen. In der Praxis wird der Schmelzpunkt T_m als messbare Größe verwendet. Der T_m beschreibt die Temperatur, bei der gebundene und freie Sequenzen im Gleichgewicht stehen. Der T_m kann in einer Schmelzkurve experimentell be-

stimmt werden. Um eine hohe Bindungsrate zu erreichen, wird ein Überschuss an Hybridisierungssonden verwendet.

Zur Typisierung von Sequenzvariationen wie einzelnen Basenaustausche, Deletionen, Insertionen oder anderen Varianten sind Hybridisierungssonden besonders gut geeignet. Bei dieser Methode werden zwei verschiedene Sonden verwendet – die „Sensor“- und die „Anker“-Sonde. Die „Sensor“-Sonde überdeckt die zu detektierende variable Sequenz. Die „Anker“-Sonde bindet in der Nachbarschaft und sorgt für die richtige Platzierung der „Sensor“-Sonde. Sie ist deutlich bindungsstärker, so dass in der Analyse der Schmelzpunkte nur die „Sensor“-Sonde erfasst wird. Hierbei werden die hybridisierten Produkte langsam unter stetiger Messung der Fluoreszenz erhitzt. Jede Änderung der Sequenz unter der Sensorsonde führt zu einer Erniedrigung des Schmelzpunktes. Eine Probe mit homozygotem Wildtyp ergibt einen definierten Schmelzpunkt, eine heterozygote Probe zwei Schmelzpunkte und eine homozygot mutierte Probe einen einheitlichen Schmelzpunkt bei einer niedrigeren Temperatur. Ein Basenaustausch alleine verursacht dabei eine Änderung von 2-10°C, abhängig von der Art des Austausches und der Nachbarschaft dieser Base.

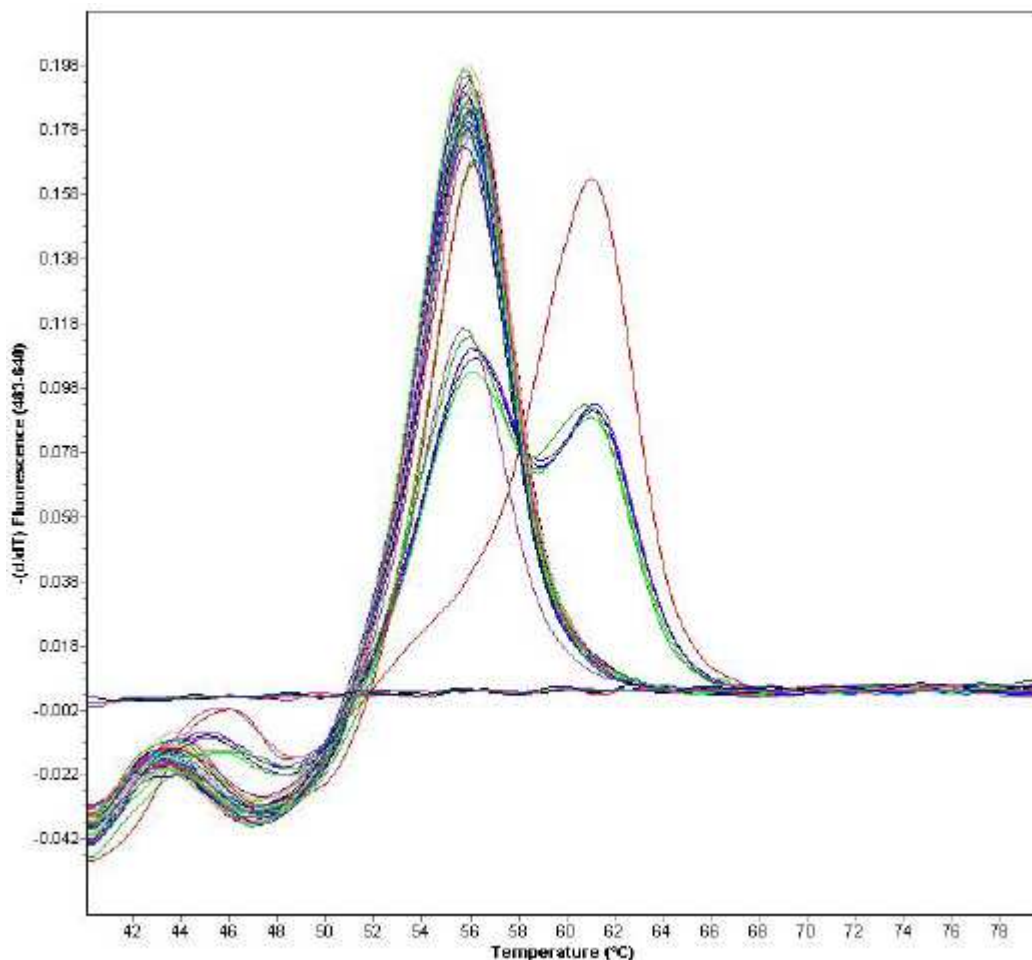


Abbildung 2.2 Schmelzpunkteanalyse zur Genotypisierung (erster Peak=Wildtyp-Allel, zweiter Peak=mutiertes Allel)

Die genetischen Varianten können allerdings nur bestimmt werden, wenn sie in ausreichenden Mengen vorliegen. Deshalb steht vor der Schmelzkurvenanalyse die Amplifikation. Sie folgt wieder dem Prinzip der o.g. PCR (siehe 2.5). Am Anfang steht eine einmalige Inkubation bei 95°C für 10 Minuten. Dabei lösen sich die beiden DNA-Stränge voneinander und der zweite Schritt das „Primer-Annealing“ kann beginnen. Bei einer für sie optimalen Temperatur (58/62°C) lagern sich die Primer gemäß ihrer Sequenz an ihren komplementären DNA-Strang an. Dieser Schritt dauert 10 Sekunden. Anschließend folgt die Extensionsphase bei einer Temperatur von 72°C für 10 Sekunden. Der Zyklus beginnt wieder mit der Denaturierungsphase bei 95°C für 10 Sekunden und wird insgesamt 45mal wiederholt. Danach schließt sich die Schmelzkurvenanalyse an. Nach einem erneuten Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 Minute wird auf 40°C für 30 Sekunden herabgekühlt, damit sich die Sonden anlagern können. Anschließend wird das Ganze langsam wieder auf 80°C erhitzt und gehalten, bis alle einzelnen Schmelzpunkte der DNA-Sequenzen analysiert sind. Zuletzt wird alles für 30 Sekunden auf 40°C abgekühlt.

Programm	Temperatur	Zeit (min:s)	Zyklen
Inkubation	95°C	10:00	1x
Amplifikation	95°C (Denaturierung)	00:10	45x
	58°C (NOD2 Ex8,11) 62°C (NOD2 Ex4) (Annealing)	00:10	
	72°C (Extension)	00:15	
Schmelzkurve	95°C	01:00	1x
	40°C	00:30	
	80°C	00:00	
Cooling	40°C	00:30	1x

Tabelle 2.9 PCR-Zyklus und Schmelzkurvenanalyse

Ein Reaktionsansatz für die PCR mit anschließender Schmelzkurvenanalyse enthält 12,5µl Wasser (PCR grade), 1µl der „Anker“-Sonde (Anchor, LC-Red 640), 1µl der „Sensor“-Sonde (Sensor, Fluorescein), 1µl Primer Reverse, 4µl LC Genotyping Master und 0,5µl einer DNA-Probe mit einer Konzentration von 100ng/µl.

C2104T (NOD2 Ex4):

5' - ttgctgcagaaggccgagccgcacaaccttcagatcacagcagccttcctggcagggct
gttgtcccgggagcactggggcctgctggctgagtgccagacatctgagaaggcctgct
c/tgggcgcaaagcctgtgcccgcctgggtgtctggcccgcagcctccgcaagcac-3'

G2722C (NOD2 Ex8):

5' - nnnnngcacatatcaggtactcactgacactgtctgttgactcttttggccttttcaga
ttctggg/cgcaacagagtggtgacgagggggccaggccctggctgaagccttgggtgat
caccagagccttgaggtggctcaggtaaagc-3'

3020insC (NOD2 Ex11):

5' - cagacatgagcagatgtgtctaaggacaggtgggcttcagtagactggctaactcctg
cagtctctttaactggacagtttcaagaggaaaaccaagaatccttgaagctcaccattgta
tcttcttttccaggttgtccaa taactgcatcacctacctaggggcagaagccctcctgca
gccccttgaaggaatgacaccatcctggaagtctggtaaggccctgggcaggcctgtttt
agctctccgaacctcagtttttctatctgtaaaatggggtgacggg-3'

Abbildung 2.3 PCR-Amplifikate für die Typisierung der NOD2-Polymorphismen

Der SNP ist rot hervorgehoben. Die Primersequenzen sind blau markiert. Die Anker- und Sensorsonden sind grün. Exon 8 und 11 sind grau unterlegt. Die unterstrichenen Basen unterscheiden sich von der Originalsequenz und wurden ausgetauscht.

2.9 RNA-Isolierung aus Darmbiopsien

2.9.1 Material

- RNAlater (Qiagen)
- RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen): RNeasy MiniColumn
 - 2 ml collection tubes
 - RPE Puffer
 - RW1 Waschpuffer
 - RLT Puffer
- QIAshredder (Qiagen)
- DSTROY-SR und 1,6 ml Reaktionsgefäße (Biozym Scientific GmbH)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen): DNase I, RNase-frei
 - Buffer RDD
 - RNase-freies Wasser
- β -Mercaptoethanol (Merck)
- 100 % Ethanol (Merck)

- Nuklease-freies Wasser, nicht DEPC-behandelt (Ambion)

2.9.2 Methode

Die Isolation totaler RNA aus Biopsaten der Darmmukosa erfolgte mit Hilfe eines im Handel käuflichen Kits (RNeasy[®] Mini Kit, Qiagen). Die Gewebeproben wurden alle während einer Kontroll- oder diagnostischen Koloskopie im Klinikum entnommen. Für Lagerung und Transport wurden die Biopsate in RNAlater eingelegt und bis zur Weiterverarbeitung kühl verwahrt. Während der gesamten Isolation wurden die Proben auf Eis gelagert. Anfangs wurde jede Probe einzeln gewogen. Insgesamt durfte ein Gewicht von 30 mg pro Probe für die Isolation nicht überschritten werden. Anschließend wurden die Gewebestücke mittels flüssigem Stickstoff schockgefroren und mit DSTROY-S-Stiften zermörsert. Um das Gewebe zu lysieren, wurde 600 µl β-Mercaptoethanol/RLT-Puffer-Lösung (Verhältnis 1:100) zugegeben. Zur Homogenisierung wurde das Lysat direkt auf eine QIAshredder spin column mit einem 2ml Sammelgefäß gegeben und 5 Minuten lang bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen und der Durchlauf weiter verwendet. Dann wurde 350 µl an 70 %igem Ethanol hinzugefügt und durchmischt. 700 µl des Gemischs wurden auf eine RNeasy mini Säule mit einem 2 ml Sammelgefäß pipettiert und 15 Sekunden bei >10000 Upm zentrifugiert. Mit dem restlichen Volumen des Gemischs wurde genauso verfahren und das Filtrat jeweils verworfen. Die gewünschte RNA blieb dabei an der Silica-Gel-Membran der Säule kleben. Nun begann der Waschvorgang. Nach Zugabe von 350 µl des RW1-Waschpuffers auf die Säule wurde wieder für 15 Sekunden bei >10000 Upm zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Damit am Ende die RNA auch nicht mit geringen Mengen an DNA verunreinigt ist, wurde noch ein zusätzlicher Schritt zur DNA-Verdauung (RNase-Free DNase Set, Qiagen) eingeschoben. Dazu wurde 80 µl DNase/RDD-Puffer-Lösung direkt auf die Membran gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte der Waschvorgang weitergeführt werden. Es wurden wieder 350 µl des RW1-Waschpuffers unter denselben Bedingungen hindurch zentrifugiert. Anschließend wurde noch zweimal mit je 500µl RPE-Waschpuffer durch Zentrifugation einmal für 15 Sekunden und einmal für 2 Minuten bei >10000 Upm gewaschen. Nach jeder Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen. Damit auch kein Rest an Puffer mehr auf der Membran bleibt, wurde noch einmal trocken für 1 Minute bei >10000 Upm zentrifugiert. Als letztes wurden zur Elution 60 µl RNase freies Wasser für 1 Minute bei >10000

Upm hindurchzentrifugiert und die so gewonnene total-RNA im 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangan und bei -80°C aufbewahrt.

Vor der weiteren Verarbeitung wurde noch die RNA-Konzentration bestimmt, was bereits unter 2.4 beschrieben wurde.

2.10 RT-PCR (cDNA-Synthese)

2.10.1 Material

- 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Applied Science):
 - 10x Reaction Buffer: 100mM Tris, 500mM KCl, pH 8,3
 - MgCl_2 25 mM
 - Deoxynucleotide-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP
 - Oligo-p(dT)₁₅Primer 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
 - RNase Inhibitor 50 units/ μl
 - AMV Reverse-Transkriptase
 - steriles Wasser
- PCR-Thermocycler (DNA Engine DYAD™, Peltier Thermal Cycler, MJ Research)

2.10.2 Methode

Um die Expression eines Genes in Zellen, Geweben oder Blutserum nachzuweisen, muss die abgelesene RNA untersucht werden. Mit der herkömmlichen PCR kann aber nur DNA mittels DNA-abhängigen DNA-Polymerasen amplifiziert werden. Diese Polymerasen sind nicht in der Lage RNA zu amplifizieren. Deshalb muss der Umweg über die cDNA (complementary DNA) genommen werden. Die komplementäre Umschreibung von mRNA zu cDNA wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase während der RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) katalysiert. Die heute eingesetzten Reverse Transkriptasen sind veränderte Enzymvarianten aus unterschiedlichen Retroviren, wie der „Moloney Murine Leukemia Virus“ (M-MLV RT) oder „Avian Myeloblastosis Virus“ (AMV RT). Diese spezifischen, RNA-abhängigen DNA-Polymerasen benötigen wie andere Polymerasen bei der PCR einen Primer zur Initiation der DNA-Synthese, welcher an die RNA bindet. Meist werden als

Primer ein Oligo-(dT)-Abschnitt (10-15 Thyminbasen), welcher komplementär zum Poly-A-Schwanz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA ist, oder „random“ Hexamere p(dN)₆ (6 zufällig zusammengesetzte Basenpaare) eingesetzt. Es können aber auch spezifische Primer verwendet werden, um gezielt ein Genprodukt zu isolieren.

Durch Klonierung und Sequenzierung von cDNA kann die Struktur der entsprechenden Gene durch deren Projektion auf das entsprechende Genom analysiert werden. Da eine cDNA zur ursprünglichen mRNA komplementär ist, enthält sie im Gegensatz zur genomischen DNA nur Exons und ist Intron-frei, weil mRNA nach ihrer Transkription bereits modifiziert und gespleißt wurde. Die cDNA ermöglicht so auch, Informationen über alternatives Splicing zu gewinnen, d.h. welche Isoformen eines Gens in welchem Gewebe oder Zelltyp vorkommen und wo sich Intron-Exon-Grenzen im Gen befinden. An Hand des genetischen Codes kann auch die Aminosäuresequenz eines Proteins eindeutig abgeleitet werden und so ein cDNA-Klon zum Expressieren der entsprechenden Proteine genutzt werden (rekombinante Proteinexpression). Über RT-PCR lässt sich also gezielt Genexpression nachweisen und über anschließende quantitative PCR die Expressionsrate der jeweils zugrundeliegenden mRNA in verschiedenen Gewebearten darstellen .

Für die cDNA-Synthese wurde ein Handel übliches Kit (1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV), Roche Applied Science) verwendet. Von der vorher aus der Darmbiopsie isolierten RNA (siehe 2.9) wurde für jede Probe 500 µg/8,2 µl Eluat verwendet. Die meisten RNA-Proben mussten wegen ihrer hohen Konzentration mit RNase freiem Wasser verdünnt werden. Die anderen wurden wegen ihrer niedrigen Konzentration mittels Wasserdampfzentrifugation mit Vakuumpumpe bis zur gewünschten Menge eingedampft. Der nächste Schritt besteht in einer Denaturierung für 15 Minuten bei 65 °C. Anschließend erfolgt noch eine Inkubation für 5 Minuten auf Eis.

Der Reaktionsansatz für die RT-PCR ist ähnlich dem der gewöhnlichen PCR. Insgesamt enthält er 2 µl 10x Reaction Buffer, 2 µl des 10mM Deoxynukleotid-Mix aus den vier verschiedenen Deoxynukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP, 2 µl Oligo(dT)₁₅-Primer, 4 µl einer 25mM MgCl₂-Lösung, 1 µl RNase Inhibitor und 0,8 µl AMV Reverse Transkriptase. Zum Schluss wurden noch die 8,2 µl denaturierte totalRNA hinzugefügt. Die PCR wurde mit einem gesamten Volumen von 20 µl durchgeführt.

Der PCR-Zyklus setzt sich mit dem Primer-Annealing-Schritt bei einer Temperatur von 25°C für 10 Minuten fort. Anschließend erfolgt die reverse Transkription der RNA zu cDNA bei 42°C für 60 Minuten. Danach muss die Reverse Transkriptase AMV bei 99°C für 5 Minuten denaturiert werden. Am Ende wurde alles für 5 Minuten auf 4°C abgekühlt.

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	65°C	15 min
Inkubation auf Eis	-5°C	5 min
Primer-Annealing	25°C	10 min
Reverse Transkription	42°C	60 min
Denaturierung der Reversen Transkriptase AMV	99°C	5 min
Cooling	4°C	5 min

Tabelle 2.10 RT-PCR-Zyklus

Die neu synthetisierte cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei –20°C gelagert. Erst im zweiten Schritt bei der PCR werden dann Gen-spezifische Primer eingesetzt.

2.11 Die quantitative PCR

2.11.1 Material

- Aqua ad injectabilia (Braun)
- LightCycler[®] FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche)
- Primer (Search LC GmbH): LightCycler[®]-Primer Set – Human GAPDH:
 - GAPDH-Primer Mix
 - Standard 200000-290000 Kopien/μl
 - Standard Stabilizer
 - Control cDNA 65000-90000 Kopien/μl
- LightCycler[®]-Primer Set – Human TLR-9:
 - TLR9-Primer Mix
 - Standard 7000-13000 Kopien/μl

- Standard Stabilizer
 - Control cDNA 15-40 Kopien/ μ l
- LightCycler[®] 480 System (Roche)

2.11.2 Methode

Die quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine quantitative Analyse möglich macht. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente ist nicht nötig. Der PCR-Zyklus beginnt wieder mit einer Denaturierungsphase der eingesetzten cDNA und Aktivierung der Polymerase für 10 Minuten bei 95°C. Der nächste Schritt besteht aus der Amplifizierung, währenddessen auch die Fluoreszenz gemessen wird. Die Amplifizierung umfasst 45 Zyklen mit jeweils den drei Phasen Denaturierung bei 95°C für 10 Sekunden, Primer-Annealing bei 68°C für 10 Sekunden und Extension bei 72°C für 16 Sekunden. Nach dem abgelaufenen PCR-Prozess wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität des PCR-Produktes bestimmt werden kann. Zum Schluss wurde alles für 30 Sekunden auf 40°C abgekühlt.

	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	95°C	10 Minuten	1x
Amplifizierung (Quantifizierung)	95°C	10 Sekunden	45x
	68°C	10 Sekunden	
	72°C	16 Sekunden	
Schmelzkurvenanalyse	95°C	0 Sekunden	1x
	58°C	10 Sekunden	
	95°C	1 Sekunde	
Abkühlung	40°C	30 Sekunden	1x

Tabelle 2.11 quantitativer PCR-Zyklus

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (58°C → 95°C). Bei einer für das Fragment spezifischen

Schmelztemperatur wird der Doppelstrang wieder ein einzelsträngiges Molekül. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und eine Fluoreszenzabnahme registriert. Somit wird sichergestellt, dass die richtigen Gensequenzen vervielfältigt wurden. Unverbrauchte Primersequenzen lagern sich während der PCR zu Dimeren zusammen. Eine Unterscheidung zu diesen unspezifischen Primerdimeren ist möglich, da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

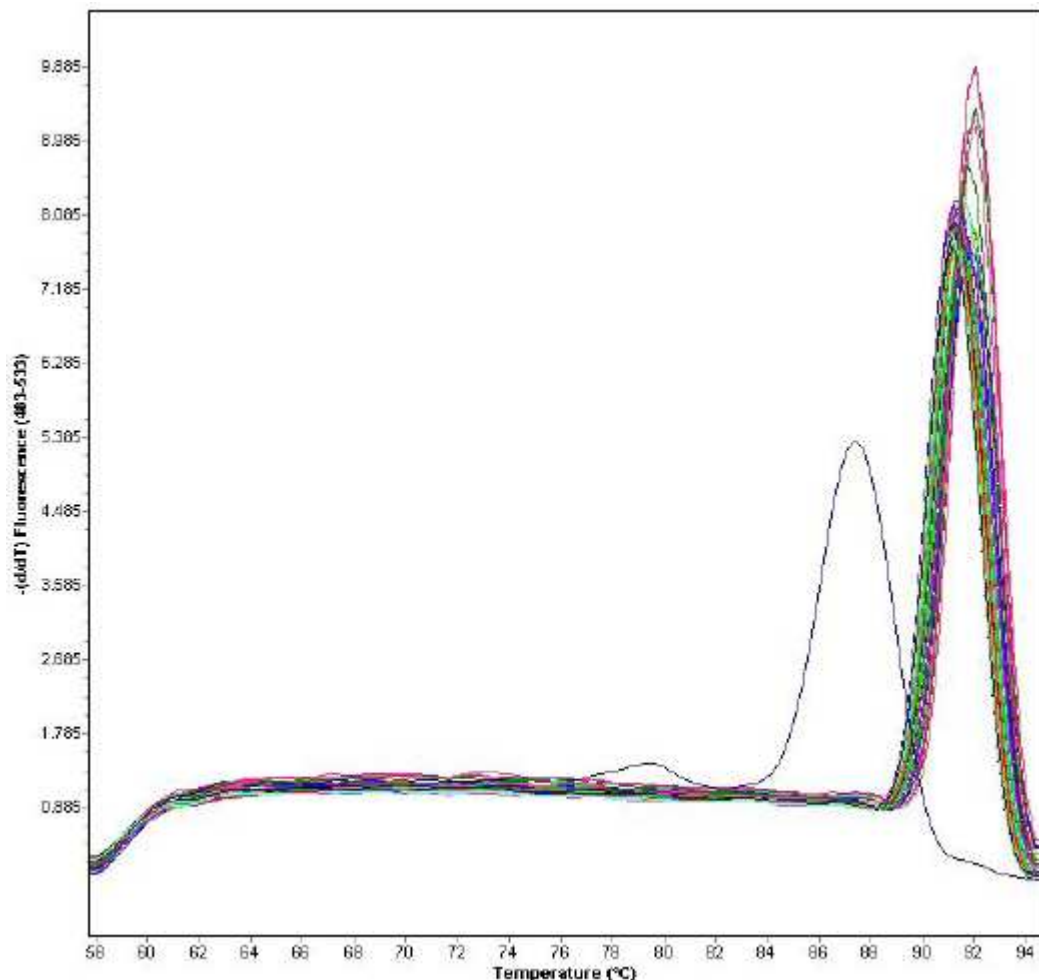


Abbildung 2.4 Schmelzpunkteanalyse zur quantitativen Messung eines bestimmten DNA-Fragments (erster einzelner Peak=unspezifische Primerdimere). Die Höhe des Peaks gibt Auskunft über die Menge des DNA-Fragments.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green verwendet. SYBR Green gehört zur Gruppe der interkalierenden Farbstoffe und bindet an doppelsträngige DNA, wodurch seine Fluoreszenz ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Der daraus resultierende DNA-Floureszenzfarbstoff-Komplex absor-

biert blaues Licht bei 498 nm und emittiert grünes Licht bei 522 nm. Weitere, wenn auch deutlich schwächere Absorptionsmaxima liegen im UV-Bereich bei etwa 300 nm und 370 nm. Zur Berechnung der Expression wurde bei jedem Lauf eine interne Standard-Kurve erstellt. Für eine Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen der eingesetzten cDNA-Menge in Triplikaten analysiert, um so die Amplifikationsrate bei unterschiedlichen Zielstrangkonzentrationen zu vergleichen. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sog. CT-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“). Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die Hintergrund-Fluoreszenz ermittelt wird. Da zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem CT-Wert eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung besteht, kann eine Standardkurve bei bekannter Ausgangsmenge durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CT-Wert konstruiert werden. Anhand dieser Standardkurve kann für jede unbekannte Probe die Kopienzahl bestimmt werden.

Um relative Expressionsunterschiede zwischen den Proben zu erkennen, werden alle Proben normalisiert, indem die errechnete Kopienzahl des Targetgens durch die Kopienzahl eines Referenzgens (housekeeping gene) geteilt wird: $\text{GEN(normalisiert)} = \text{Kopienzahl Target} / \text{Kopienzahl Referenz}$. Als Referenzgene werden sog. Housekeeping-Gene verwendet. Darunter versteht man Gene, welche nicht reguliert werden und in jedem Zelltyp und in jedem Zellstadium konstant exprimiert werden. In der Regel sind das Gene, die in den Grundstoffwechsel der Zellen, z.B. den Glukose-Stoffwechsel, involviert sind. Hier wurde für den relativen Mengen-Vergleich (relative Quantifizierung) als Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgemessen. GAPDH ist ein Enzym aus der Glykolyse und wird in fast allen Geweben auf hohem Level exprimiert.

Der 20 µl PCR-Ansatz enthielt 2 µl SYBR Green, 2 µl Primer, 6 µl Wasser und 10 µl cDNA (1:10 Verdünnung). Die spezifischen Primer von TLR9 und dem Housekeeping-Gen GAPDH wurden von einem speziellen Unternehmen (Search LC GmbH, Heidelberg) bezogen. Bei jedem Lauf wurde eine Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt. Die Funktionalität der Primer wurden zu Beginn mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Die Standard-Verdünnungsreihe bestand aus 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 Verdünnungen. Dabei enthielten die 1:1-Standardlösungen je nach LightCycler®-Primer Set 200000, 260000 und 290000 Kopien/µl Kopien für GAPDH und 7000, 8000 und 13000 Kopien/µl für TLR9. Alle Ergebnisse wurden im Verhältnis TLR9/GAPDH dargestellt.

2.12 Sonstige Geräte

- Waage (Kern, Adam)
- Tisch-Zentrifuge (neoLab[®])
- Zentrifugen: Allegra™ 25R Centrifuge (Beckman coulter™)
 - Microfuge[®] 22R Centrifuge (Beckman coulter™)
 - Microfuge[®] 18 Centrifuge (Beckman coulter™)
 - Allegra[®] X-15R Centrifuge (Beckman coulter™)
- Vortex Mixer (neoLab, Thermo)
- Pipetten mit Pipettenspitzen 10, 20, 100, 200, 1000 µl (Eppendorf, Biozym Scientific GmbH)
- Reaktionsgefäße (Biozym Scientific GmbH)
- Kühl- und Gefrierschrank
- Stickstofftank
- sterile Skalpelle
- Brutschränke
- Mikrowelle (Sharp)
- Wasserdampfzentrifuge 46°C mit eingebauter Vakuumzentrifuge
- Thermoblock
- Wasserbad
- Thermomixer comfort (Eppendorf)

2.13 Statistische Auswertung

Da es sich bei dieser Studie um eine Assoziationsstudie handelt, die den möglichen Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen und klinischen Krankheitsbildern untersucht, werden Patienten und gesunde Kontrollpersonen miteinander verglichen und daraus das Signifikanzniveau der Assoziation berechnet. Für den Vergleich der Allel-, Genotyp- und Haplotypfrequenzen der Testgruppen wurden der Chi-Quadrat- (χ^2 -Test) und der Fisher's-Exact-Test verwendet. Dabei wurde die Verteilung der Genotypfrequenzen mit den bei Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts erwarteten Frequenzen verglichen. Für den Vergleich vieler verschiedener Elemente wurde die Korrektur nach Bonferroni verwendet. Um Unterschiede der konstanten Variablen zwischen den Gruppen zu vergleichen, wurde der

U-Test nach Mann-Whitney angewandt. Für Unterschiede innerhalb derselben Gruppe wurde der Wilcoxon-Test benutzt. Zur Berechnung wurde als Computersoftware das Statistikprogramm SPSS Version 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) benutzt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert unter 0,05 gewählt.

2.13.1 Chi-Quadrat-Test (χ^2 -Test)

Mit dem χ^2 -Test untersucht man Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit. Dabei wurde der Vierfeldertest verwendet. Er dient dazu, die Häufigkeit eines Merkmals in zwei statistisch unabhängigen Gruppen zu vergleichen. Der Vierfeldertest läuft nach folgendem Schema ab:

	Patienten	Kontrolle	Summe
Positiv	a	b	a + b
Negativ	c	d	c + d
Summe	a + c	b + d	n = a + b + c + d

Tabelle 2.12 Vierfeldertest

Um festzustellen, ob bei den Stichproben (positiv und negativ) signifikante Unterschiede bestehe und wie groß die Wahrscheinlichkeit für einen Zufallsbefund ist, wird die Prüfsumme berechnet:

$$\chi^2 = \frac{n * (a * d - c * b - n/2)^2}{(a + c) * (b + d) * (a + b) * (c + d)}$$

Diese Formel darf nur dann verwendet werden, wenn in jeder der beiden Stichproben mindestens sechs Merkmalsträger enthalten sind.

Die Signifikanz lässt sich in drei Stufen einteilen:

1. Signifikanzniveau (5%-Stufe, $p \leq 0,05$) $3,84 \leq \chi^2 < 6,64$ signifikant
2. Signifikanzniveau (1%-Stufe, $p \leq 0,01$) $6,64 \leq \chi^2 < 10,83$ hochsignifikant
3. Signifikanzniveau (0,1%-Stufe, $p \leq 0,001$) $10,83 \leq \chi^2$ höchstsignifikant

Dieser Test besitzt als 2x2-Feld nur einen Freiheitsgrad (df). Für multiple Vergleiche wurden die Signifikanzwerte nach Bonferroni korrigiert. Für die Korrektur der p-Werte wurde folgende Formel verwendet:

$$p_{\text{corr}} = p * (df + 1)$$

Damit dieser Test anwendbar ist, muss der Erwartungswert aller vier Felder mindestens 5 betragen. Der Erwartungswert errechnet sich aus Zeilensumme * Spaltensumme/Gesamtzahl. Bei einem Erwartungswert kleiner 5 empfehlen Statistiker den exakten Fisher-Test.

2.13.2 Fisher-Exakt-Test

Der exakte Fisher-Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel, der auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Im Anwendungsgebiet entspricht er dem Chi-Quadrat-Test, wenn dieser wegen zu geringem Stichprobenumfang nicht anwendbar ist. Der exakte Test bildet Kombinationen von Zellohäufigkeiten, die bei festen Zeilen- und Spaltensummen entstehen könnten, und berechnet die bedingte Wahrscheinlichkeit für die Zellohäufigkeiten. Die genaue Berechnung ist sehr kompliziert und wird mittels einseitigem und zweiseitigem Test durchgeführt.

2.13.3 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist ein Begriff aus der Populationsgenetik. Zur Berechnung dieses mathematischen Modells geht man von einer in der Realität nicht vorzufindenden idealen Population aus, in der sich weder die Häufigkeiten der Allele noch die Häufigkeiten der Genotypen verändern, da diese sich im modellierten Gleichgewicht finden. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wird trotz seines modellhaften Charakters zum Ableiten von populationsgenetischen Gesichtspunkten vom Modell auf die Realität verwendet.

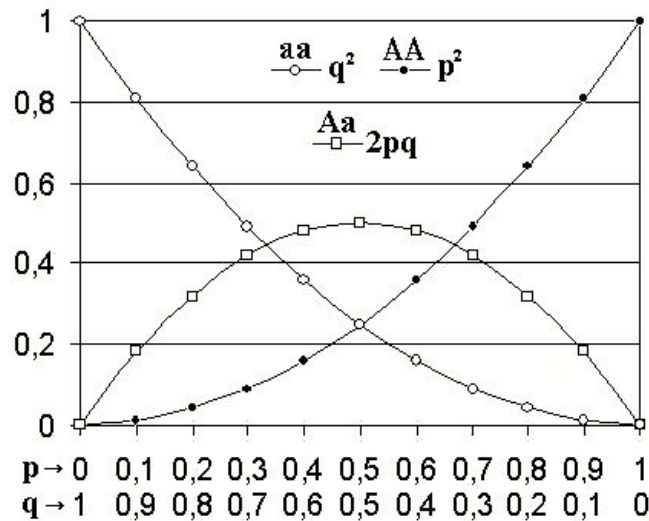


Abbildung 2.5 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für zwei Allele

Die horizontale Achse zeigt die beiden Allelfrequenzen p und q, die vertikale Achse zeigt die Genotypfrequenzen. Die drei möglichen Genotypen sind durch unterschiedliche Zeichen dargestellt.

Die in dieser Arbeit beobachteten Genotypfrequenzen wurden mit den nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarteten Frequenzen verglichen. Dabei kamen folgende Formeln zur Anwendung:

$$F_{AA} = f_A^2$$

$$F_{AB} = 2 * f_A * f_B$$

$$F_{BB} = f_B^2$$

A: Allel A

B: Allel B

F: erwartete Genotypfrequenz

f: beobachtete Allelfrequenz

	A	B
A	AA (f_A^2)	AB ($f_A * f_B$)
B	AB ($f_A * f_B$)	BB (f_B^2)

Tabelle 2.13 Punnett-Quadrat zur Berechnung der Genotypfrequenzen für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Signifikanz wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \frac{(\text{beobachtete Frequenz} - \text{erwartete Frequenz})^2}{\text{beobachtete Frequenz}}$$

Das Signifikanzniveau wird auch hier nach den drei o. g. Stufen ausgedrückt.

2.13.4 Korrektur nach Bonferroni

Mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur wird die Alphafehler-Kumulierung bei Verwendung multipler Signifikanztests neutralisiert. Untersucht man bei einem Datensatz mehrere Untergruppen, d.h. prüft man mehrere 0-Hypothesen, so steigt die Wahrscheinlichkeit, einen signifikanten Unterschied bei einem oder mehreren der Vergleiche zu finden, mit der Anzahl der Berechnungen. Für jede 0-Hypothese gilt ein Signifikanzniveau von 5%, d.h. ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit α von $p < 0,05$ wird die 0-Hypothese verworfen. Die Wahrscheinlichkeit, dass die 0-Hypothese zutrifft, beträgt damit 0,95. Werden zwei 0-Hypothesen getestet, ist die Wahrscheinlichkeit, dass keiner der Tests signifikant ist, $0,95 \times 0,95 = 0,90$. Werden 20 solcher Hypothesen getestet, ist die Wahrscheinlichkeit, dass keine signifikant ist, $0,95^{20} = 0,36$. Somit ist eine Wahrscheinlichkeit, zumindest ein signifikantes Ergebnis zu bekommen, von $1 - 0,36 = 0,64$ gegeben. Um dies zu vermeiden, wird das Signifikanzniveau für jeden Einzeltest nach der Bonferroni-Korrektur angepasst. D.h. das Signifikanzniveau α wird durch die Anzahl (m) der durchgeführten Tests geteilt und es gilt das neue Signifikanzniveau $\alpha' = \alpha/m$.

2.13.5 Mann-Whitney U-Test

Der Mann-Whitney U-Test ist ein Homogenitätstest. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also ob zwei unabhängige Verteilungen A und B zu derselben Grundgesamtheit gehören. Nullhypothese ist, dass beide zu vergleichenden Populationen gleich verteilt sind. Die Werte n der kombinierten Stichproben werden in eine einzige Rangreihe gebracht, wobei jeder der Beobachtungen ein Rang zugewiesen wird. Dann werden die Ränge für die einzelnen Stichproben aufsummiert (R1 für die erste Stichprobe, R2 für die zweite). Diese Rangsummen sollten etwa gleich groß sein, wenn beide Stichproben aus derselben Population stammen und dem Erwartungswert der Ränge entsprechen. Nun lassen sich zwei Größen berechnen:

$$U1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

U1 und U2 werden nun mit der Testgröße U verglichen.

Beim einseitigen Test ist die Testgröße

$$U = n_1 * n_2 / 2 - u(\alpha) * \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}.$$

und beim zweiseitigen Test:

$$U = n_1 * n_2 / 2 - u(\alpha/2) * \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}.$$

Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn U1 bzw. U2 < U ist.

2.13.6 Wilcoxon-Test

Der Wilcoxon-Test ist die nichtparametrische Entsprechung zum t-Test für abhängige Stichproben, d.h. für den Vergleich gepaarter Beobachtungen. Zuerst werden die Differenzen aus den Wertepaaren gebildet und mit Vorzeichen aufgelistet. Anschließend werden die absoluten Differenzbeträge in eine ansteigende Rangordnung gebracht. Ergeben sich Differenzen von 0, so werden diese in der Vergabe von Rangplätzen nicht berücksichtigt. Der kleinste Betrag erhält die Rangzahl 1 und der größte die Rangzahl n. Bei gleichgroßen Beträgen werden mittlere Rangzahlen zugeordnet. Bei jeder Rangzahl wird vermerkt, ob die zugehörige Differenz ein positives oder ein negatives Vorzeichen aufweist. Dann bildet man die Summe der positiven und der negativen Rangzahlen (R_p und R_n) und benutzt als Testgröße die kleinere der beiden Rangsummen (R). Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der berechnete R-Wert kleiner oder gleich dem kritischen Wert $R_{n;\alpha}$ ist. Der kritische Wert $R_{n;\alpha}$ wird aus einer Tabelle abgelesen.

3. Ergebnisse

3.1 Polymorphismen im TLR9-Gen

3.1.1 Der -T1237C-Polymorphismus im TLR9-Gen

Der Nachweis des -T1237C-Promotorpolymorphismus des TLR9-Gens erfolgte mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse. Nach durchgeführter PCR wurde das 168 bp Amplifikat mit dem Restriktionsenzym BstN I verdaut. Je nach Genotyp entstanden verschieden lange Fragmente, die dann durch Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht wurden. Das PCR-Produkt für das Wildtyp-Allel homozygote Genotyp (-1237TT) wurde nicht geschnitten und als 168 bp Fragment nachgewiesen. Der für das mutierte Allel homozygote Genotyp (-1237CC) dagegen wurde in die zwei kleinere Fragmente von 125 bp und 43 bp geteilt. Der heterozygote Genotyp (-1237CT) enthielt bei der Analyse wegen der Allelmischung alle drei Fragmente (168 bp, 125 bp und 43 bp).

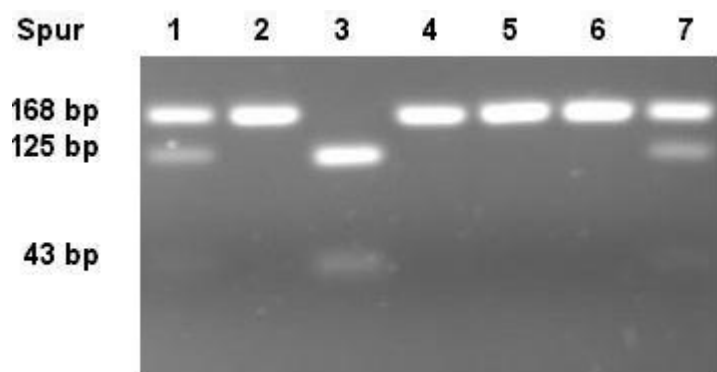


Abbildung 3.1 -T1237C-Polymorphismus des TLR9-Gens

Spur 1, 7: heterozygoter Genotyp (-1237TC)

Spur 2, 4, 5, 6: homozygoter Genotyp für das Wildtyp-Allel (-1237TT)

Spur 3: homozygoter Genotyp für das mutierte Allel (-1237CC)

In der ersten Studie (Török 2004b) waren sowohl die Allelfrequenz für das C-Allel als auch die Häufigkeit des C-Träger-Status (= die Genotypen -1237TC und -1237CC zusammengefasst) bei den Morbus Crohn – Patienten signifikant im Vergleich zur Kontrollpopulation erhöht (19,3 % vs. 11,9 %, $p = 0,0036$ bzw. 34,5 % vs. 22,6 %, $p = 0,0093$, OR 1,80, 95% CI 1,15-2,81). Die Häufigkeit des Polymorphismus in der Colitis ulcerosa – Gruppe zeigte im

Vergleich zur Kontrollgruppe nur eine minimale Erhöhung, die aber statistisch keinen signifikanten Unterschied ergab.

In der hier durchgeführten Replikationsstudie waren die Allel- und Genotypfrequenzen für die –1237T/C-Polymorphismen in der Gruppe der Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa vergleichbar zu denen der Kontrollpopulation. Die beiden CED-Populationen waren in der Verteilung des Genotyps vergleichbar. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Alle Allel- und Genotypfrequenzen sind in den Tabellen 3.1-3.4 zusammengefasst.

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	T	C	TT	TC	CC
Morbus Crohn n = 286	497 (86,9 %)	75 (13,1 %) p = n.s.	213 (74,5 %)	71 (24,8 %)	2 (0,7 %)
Colitis ulcerosa n = 108	187 (86,6 %)	29 (13,4 %)	81 (75,0 %)	25 (23,1 %)	2 (1,9 %)
Kontrollen n = 527	908 (86,1 %)	146 (13,9 %)	388 (73,6 %)	132 (25,0 %)	7 (1,3 %)

Tabelle 3.1 Allel- und Genotypfrequenzen des –1237T/C-Polymorphismus in der ersten Replikationsstudie

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	T	C	TT	TC	CC
Morbus Crohn n = 145	251 (86,6 %)	39 (13,4 %) p = n.s.	108 (74,5 %)	35 (24,1 %)	2 (1,4 %)
Colitis ulcerosa n = 102	174 (85,3 %)	30 (14,7 %)	73 (71,6 %)	28 (27,5 %)	1 (1,0 %)

Tabelle 3.2 Allel- und Genotypfrequenzen des –1237T/C-Polymorphismus in der zweiten Replikationsstudie

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	T	C	TT	TC	CC
Morbus Crohn n = 605	1029 (85,0 %)	181 (15,0 %) p = n.s.	435 (71,9 %)	159 (26,3 %)	11 (1,8 %)
Colitis ulcerosa n = 348	598 (86,0 %)	98 (14,1 %)	256 (73,6 %)	86 (24,7 %)	6 (1,7 %)
Kontrollen n = 792	1375 (86,8 %)	209 (13,2 %)	593 (74,8 %)	189 (23,9 %)	10 (1,3 %)

Tabelle 3.3 Allel- und Genotypfrequenzen des -1237T/C-Polymorphismus in allen Studien zusammen

Auch bei Betrachtung der kumulierten Studienpopulation ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Allel- und Genotypfrequenzen zwischen den Morbus Crohn bzw. Colitis ulcerosa Patienten und der Kontrollpopulation. Insgesamt war die Frequenz des mutierten C-Allels 15,0% bei Morbus Crohn, 13,2% bei den Kontrollen und 14,0% bei Colitis ulcerosa. Die Trägerfrequenzen für -1237C waren 28,1% bei Morbus Crohn im Vergleich zu 25,1% bei den Kontrollen (OR 1,16, 95% CI 0,91-1,49, p=0,235) und 26,4% bei Colitis ulcerosa (OR 1,07, 95% CI 0,79-1,44, p=0,694 vs. Kontrollen).

Die Verteilung der Genotypen entsprach in allen Populationen dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

3.1.2 Der A2848G-Polymorphismus im TLR9-Gen

Auch der Nachweis des A2848G-Polymorphismus im Exon 2 des TLR9-Gens erfolgte mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse. Nach durchgeführter PCR wurde das 152 bp PCR-Amplifikat mit dem Restriktionsenzym Nru I verdaut. Je nach Genotyp entstanden verschieden lange Fragmente, die dann durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt wurden. Der für das A-Allel homozygote Genotyp (2848AA) wurde nicht geschnitten und als 152 bp Fragment nachgewiesen. Der für das G-Allel homozygote Genotyp (2848GG) dagegen wurde in die zwei Fragmente 124 bp und 28 bp geteilt. Das PCR-Produkt von heterozygoten Individuen (2848AG) enthielt nach Verdau wegen der Allelmischung alle drei Größen von Fragmenten (152 bp, 124 bp und 28 bp).

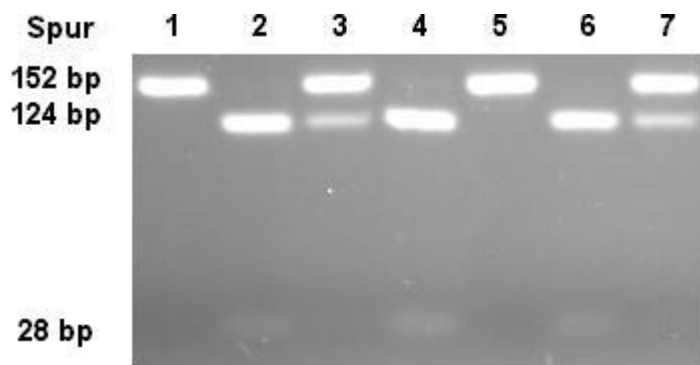


Abbildung 3.2 A2848G-Polymorphismus des TLR9-Gens

Spur 1, 5: homozygoter Genotyp für das Wildtyp-Allel (2848AA)

Spur 2, 4, 6: homozygoter Genotyp für das mutierte Allel (2848GG)

Spur 3, 7: heterozygoter Genotyp (2848 AG)

Für den 2848A/G-Polymorphismus wurden in der ersten Studie (Török 2004b) keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Allelfrequenzen zwischen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und den Kontrollen gefunden. Nur die Frequenz des 2848AG-Genotyps zeigte bei den Morbus Crohn – Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine leichte Erniedrigung (43,1% vs. 54%, $p = 0,0328$). In den hier durchgeführten Replikationsstudien konnte weder innerhalb der Allelfrequenzen noch innerhalb der Genotypfrequenzen ein signifikanter Unterschied zwischen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten und der Kontrollpopulation festgestellt werden. Alle Allel- und Genotypfrequenzen sind in den Tabellen 3.4-3.6 zusammengefasst.

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	A	G	AA	AG	GG
Morbus Crohn n = 287	314 (54,7 %)	260 (45,3 %)	82 (28,6 %)	150 (52,3 %)	55 (19,2 %)
Colitis ulcerosa n = 110	126 (57,3 %)	94 (42,3 %)	40 (36,4 %)	46 (41,8 %)	24 (21,8 %)
Kontrollen n = 527	616 (58,4 %)	438 (41,6 %)	182 (34,5 %)	252 (47,8 %)	93 (17,6 %)

Tabelle 3.4 Allel- und Genotypfrequenzen des 2848A/G-Polymorphismus in der ersten Replikationsstudie

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	A	G	AA	AG	GG
Morbus Crohn n = 145	151 (52,1 %)	139 (47,9 %)	42 (29,0 %)	67 (46,2 %)	36 (24,8 %)
Colitis ulcerosa n = 102	111 (54,4 %)	93 (45,6 %)	31 (30,4 %)	49 (48,0 %)	22 (21,6 %)

Tabelle 3.5 Allel- und Genotypfrequenzen des 2848A/G-Polymorphismus in der zweiten Replikationsstudie

	Allelfrequenzen Anzahl (%)		Genotypfrequenzen Anzahl (%)		
	A	G	AA	AG	GG
Morbus Crohn n = 606	660 (54,5 %)	552 (45,5 %)	184 (30,4 %)	292 (48,2 %)	130 (21,5 %)
Colitis ulcerosa n = 350	393 (56,1 %)	307 (43,9 %)	111 (31,7 %)	171 (48,9 %)	68 (19,4 %)
Kontrollen n = 792	919 (58,0 %)	665 (42,0 %)	262 (33,1 %)	395 (49,9 %)	135 (17,0 %)

Tabelle 3.6 Allel- und Genotypfrequenzen des 2848A/G-Polymorphismus in allen Studien zusammen

Insgesamt war die Frequenz des mutierten G-Allels 45,5% bei Morbus Crohn, 42,0% bei den Kontrollen und 43,9% bei Colitis ulcerosa. Die Trägerfrequenzen für 2848G waren 69,6% bei Morbus Crohn im Vergleich zu 66,9% bei den Kontrollen (p=n.s) und 68,3% bei Colitis ulcerosa (p=n.s. vs. Kontrollen).

In allen Studiengruppen entsprach die Verteilung der Genotypen dieses Polymorphismus dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

3.2 Mutationen im NOD2-Gen

Um mögliche Interaktionen mit den getesteten TLR9-Polymorphismen feststellen zu können, wurden alle Patienten und Kontrollen zusätzlich auf das Vorhandensein der drei MC-Risiko-assoziierten NOD2-Mutationen 1007fs (3020insC/Leu1007fsinsC), R702W (C2104T/Arg702Trp) und G908R (G2722C/Gly908Arg) untersucht. Der Nachweis erfolgte einerseits mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Analyse und andererseits mittels Hybridisierungssondentypisierung. C2104T und G2722C sind beides Punktmutationen einmal an Position 2104 im Exon 4 und einmal an Position 2722 im Exon 8 des Gens, während 3020insC eine Cytosinininsertion an Position 3020 im Exon 11 ist. Die Bestimmung der einzelnen Genotypen der Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten wurde in einer früheren Arbeit unseres Labors mit der RFLP-Analyse durchgeführt und beschrieben (Török 2004a). Die Genotypisierung der drei NOD2-Varianten in den Kontrollpopulationen wurde mit der Hybridisierungssondenmethode durchgeführt.

Die einzelnen Genotypfrequenzen der drei Polymorphismen sind in den Tabellen 3.7-3.10 zusammengefasst.

	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
1007fs (3020insC)	483 (80,5%)	97 (16,2%)	20 (3,3%)
R702W (C2104T)	500 (83,3%)	90 (15,0%)	10 (1,7%)
G908R (G2722C)	553 (92,2%)	45 (7,5%)	2 (0,3%)

Tabelle 3.7 Verteilung der NOD2-Mutationen (Genotypfrequenzen) der MC-Population (n=600)

	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
1007fs (3020insC)	224 (97,0%)	7 (3,0%)	0 (0%)
R702W (C2104T)	212 (91,8%)	18 (7,8%)	1 (0,4%)
G908R (G2722C)	223 (96,6%)	7 (3,0%)	1 (0,4%)

Tabelle 3.8 Verteilung der NOD2-Mutationen (Genotypfrequenzen) der CU-Population (n=231)

	Wildtyp	Heterozygot	Homozygot
1007fs (3020insC)	730 (94,6%)	42 (5,4%)	0 (0%)
R702W (C2104T)	699 (90,6%)	69 (8,9%)	4 (0,5%)
G908R (G2722C)	735 (95,2%)	37 (4,8%)	0 (0%)

Tabelle 3.9 Verteilung der NOD2-Mutationen (Genotypfrequenzen) der Kontroll-Population (n=772)

	Wildtyp	1 mutiertes NOD2-Allel	2 mutierte NOD2-Allele
MC	364 (60,7%)	174 (29,0%)	62 (10,3%)
CU	197 (85,3%)	30 (13,0%)	4 (1,7%)
Kontrollen	626 (81,1%)	136 (17,6%)	10 (1,3%)

Tabelle 3.10 Verteilung der NOD2-Mutationen

3.3 Interaktionen zwischen den TLR9-Polymorphismen und NOD2-Mutationen bei Morbus Crohn – Patienten

Für das NOD2-Gen sind drei Mutationen bekannt, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen („loss-of-function mutations“). Die Erkennung des bakteriellen Bestandteils Muramyl-Dipeptid (MDP) ist bei Vorhandensein dieser Mutationen gestört. Eine funktionelle Studie konnte bereits zeigen, dass eine NOD2-Stimulation normalerweise die Immunantwort auf CpG DNA erhöht. Dieser synergistische Effekt zwischen NOD2 und TLR9 geht in Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen verloren (van Heel 2005b). Weitere Studien zeigten, dass TLR9 (Rumio 2004) und NOD2 (Lala 2003) eng zu den Sekretionsgranula im intrazellulären Kompartiment der Paneth Zellen exprimiert werden, was vermuten lässt, dass doppelte Signale über NOD2 und TLR9 für effiziente bakterielle Bekämpfung im Darm notwendig sind.

Diese funktionellen Interaktionen könnten sich in genetischen Interaktionen widerspiegeln. Um mögliche Interaktionen zwischen den beiden Genen festzustellen, wurde die Häufigkeit der TLR9-Polymorphismen in Abhängigkeit vom NOD2-Status untersucht. Da die Frequenz der homozygoten -1237CC-Träger des -1237T/C-Promoterpolymorphismus sehr gering ist, werden die Daten nur für -1237C-Träger (d.h. summierte Frequenz der homozygoten -1237CC-Träger und heterozygoten -1237CT-Träger) präsentiert (siehe Tabelle 3.11).

Ein signifikanter Anstieg der -1237C-Träger-Frequenz war bei NOD2-positiven (d.h. Träger mindestens einer NOD2-Variante) im Vergleich zu NOD2-negativen Morbus Crohn – Patienten sichtbar (34,9% vs. 23,6%, p=0,003). Dieses Ungleichgewicht wurde in allen 3 Morbus Crohn-Kohorten mit einer über 10% höheren Frequenz für -1237C-Trägern innerhalb der NOD2-positiven Patienten im Vergleich zu NOD2-negativen Morbus Crohn-Patienten beobachtet.

	-1237C-Trägerfrequenz	Signifikanz vs. Kontrollen p-Wert, OR, 95% CI
MC Kohorte 1 (n=174)		
NOD2 Wildtyp	30/99 (30,3%)	
NOD2 einfach-mutiert	17/51 (33,3%)	
NOD2 doppelt-mutiert	13/24 (54,2%)	
insgesamt NOD2-positiv	30/75 (40,0%)	
MC Kohorte 2 (n=281)		
NOD2 Wildtyp	37/174 (21,3%)	
NOD2 einfach-mutiert	24/79 (30,5%)	
NOD2 doppelt-mutiert	10/28 (35,7%)	
insgesamt NOD2-positiv	34/107 (31,8%)	
Kohorte 3 (n=145)		
NOD2 Wildtyp	19/92 (20,7%)	
NOD2 einfach-mutiert	14/44 (31,8%)	
NOD2 doppelt-mutiert	4/9 (44,4%)	
insgesamt NOD2-positiv	18/51 (35,3%)	
MC gesamt (1+2+3, n=600)		
NOD2 Wildtyp	86/365 (23,6%)	n.s.
NOD2 einfach-mutiert	55/174 (31,6%)	
NOD2 doppelt-mutiert	27/61 (44,3%)	p=0,002, 2,37 (1,35-4,15)
insgesamt NOD2-positiv	82/235 (34,9%)	p=0,004, 1,60 (1,15-2,21)
CU gesamt (n=231)		
NOD2 Wildtyp	49/198 (24,7%)	
NOD2 einfach-mutiert	6/30 (20,0%)	
NOD2 doppelt-mutiert	2/3 (66,7%)	
insgesamt NOD2-positiv	8/33 (24,2%)	

Kontrollen gesamt (1+2, n=772)	
NOD2 Wildtyp	161/626 (25,7%)
NOD2 einfach-mutiert	34/136 (25,0%)
NOD2 doppelt-mutiert	2/10 (20,0%)
insgesamt NOD2-positiv	36/146 (24,7%)

Tabelle 3.11 Verteilung des -1237T/C-Polymorphismus nach Stratifizierung bezüglich des NOD2-Genotyps

Desweiteren war ein Gen-Dosis-Effekt zu erkennen. Die -1237C-Trägerfrequenz war 31,6% bei Morbus Crohn-Patienten mit einem mutierten NOD2-Allel und stieg bei Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen auf 44,3% an (p=0,001 vs. NOD2-negativ).

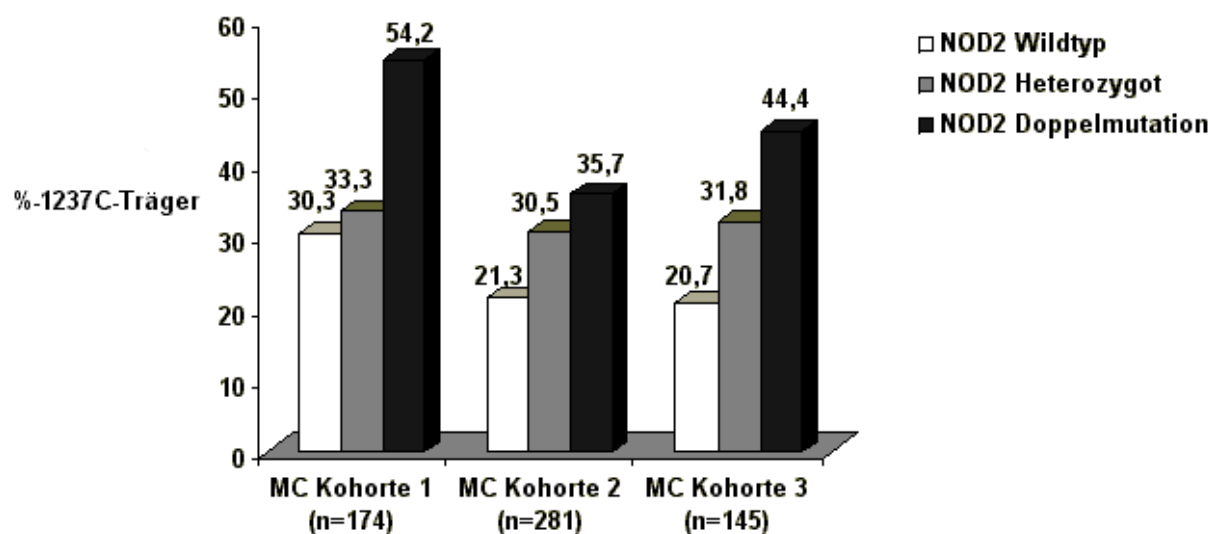


Abbildung 3.3 Häufigkeit von -1237C-Trägern bei MC-Patienten der einzelnen Populationen in Abhängigkeit vom NOD2-Status

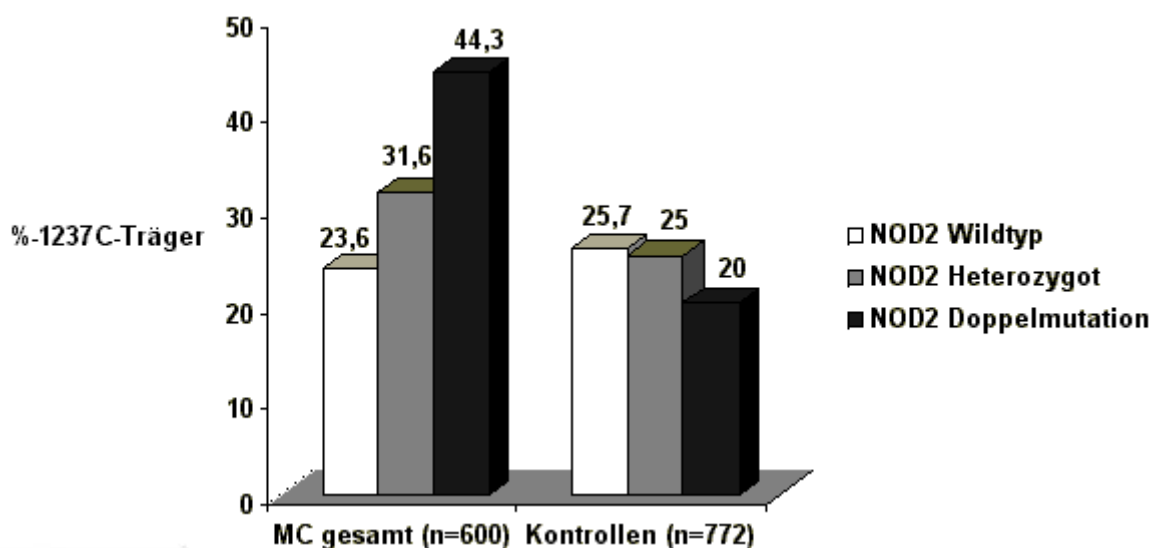


Abbildung 3.4 Häufigkeit von -1237C-Trägern bei allen MC-Patienten in Abhängigkeit vom NOD2-Status

Um auszuschließen, dass die beobachtete Interaktion z.B. einen Überlebensvorteil widerspiegelt, wurde überprüft, ob diese Assoziation unabhängig von Morbus Crohn auch in Kontrollen und Colitis ulcerosa – Patienten vorhanden ist. Dazu wurden alle Kontrollen und Colitis ulcerosa-Patienten auf die drei NOD2-Varianten getestet. Im Gegensatz zu Morbus Crohn war bei den Kontrollen und Colitis ulcerosa – Patienten kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der –1237T/C-Polymorphismen in Bezug auf den NOD2-Status zu sehen. Die –1237C-Trägerfrequenz war 25,7% in NOD2-negativen und 24,7% in NOD2-positiven Kontrollen ($p=0,834$) und 24,7% in NOD2-negativen und 24,2% in NOD2-positiven Colitis ulcerosa-Patienten ($p=1,00$). Somit war die Interaktion zwischen den beiden Genen Crohn-spezifisch. Insgesamt waren 235 der 600 Morbus Crohn-Patienten (39,2%) NOD2-positiv verglichen zu 146 der 772 Kontrollen (18,9%), was einer OR von 2,75, 95% CI (2,14-3,53) für Träger mindestens einer NOD2-Variante entspricht. Das relative Risiko an MC zu erkranken, stieg für kombinierte Träger einer NOD2-Variante und der –1237C TLR9-Variante (13,3% bei Morbus Crohn und 4,7% bei Kontrollen) auf OR 3,15, 95% CI (2,05-4,83). Die Frequenz von Individuen mit zwei mutierten NOD2-Allelen = homozygot und gemischt heterozygot war 10,2% bei MC verglichen mit 1,3% bei Kontrollen (OR 8,62, 4,23-18,0). Für diese Individuen stieg das relative Risiko bei gleichzeitigem Vorkommen der –1237C-TLR9-Variante auf OR=18,14, 95% CI (4,18-111,0).

Die getrennte Analyse der drei Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Varianten zeigt Interaktionen aller Varianten mit dem TLR9-Polymorphismus –1237T/C.

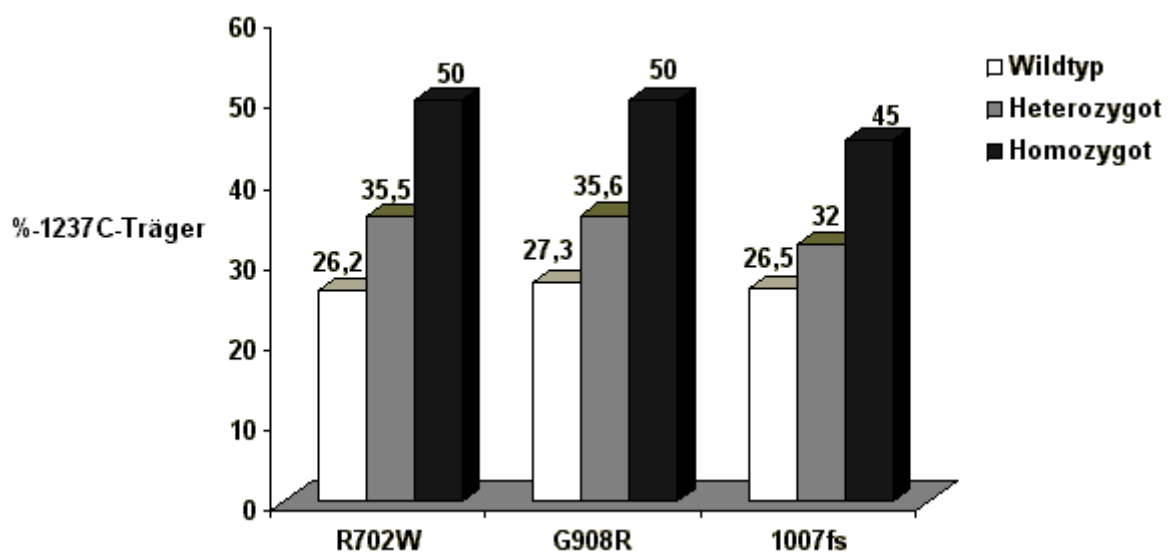


Abbildung 3.5 MC-1237C-Trägerfrequenzen bei getrennter Analyse der drei NOD2-Varianten bei Morbus Crohn

Für den TLR9-Polymorphismus 2848A/G wurden keine signifikanten Unterschiede nach Stratifizierung bezüglich des NOD2-Status beobachtet.

	Genotyp	NOD2				p-Wert
		NOD2+			NOD2-	
		Patienten mit einem mutierten Allel	Patienten mit zwei mutierten Allelen	NOD2+ gesamt		
MC	AA	49 (8,2%)	19 (3,1%)	68 (11,3%)	114 (18,9%)	n.s.
	AG	82 (13,7%)	35 (5,8%)	117 (19,5%)	173 (28,8%)	
	GG	43 (7,2%)	8 (1,3%)	51 (8,5%)	78 (13,0%)	
CU	AA	6 (2,6%)	0 (0%)	6 (2,6%)	70 (30,0%)	n.s.
	AG	18 (7,7%)	3 (1,3%)	21 (9,0%)	92 (39,5%)	
	GG	6 (2,6%)	1 (0,4%)	7 (3,0%)	37 (15,9%)	
Kontrollen	AA	39 (5,1%)	4 (0,5%)	43 (5,6%)	217 (28,1%)	n.s.
	AG	70 (9,1%)	4 (0,5%)	74 (9,6%)	306 (39,6%)	
	GG	27 (3,5%)	2 (0,3%)	29 (3,8%)	103 (13,3%)	

Tabelle 3.12 2848G-Trägerfrequenzen nach Stratifizierung bezüglich des NOD2-Genotyps

3.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bei Vorhandensein von NOD2-Mutationen gewisse phänotypische Charakteristika gehäuft bei MC vorkommen, stellt sich die Frage, ob auch die Polymorphismen im TLR9-Gen Auswirkungen auf das klinische Erscheinungsbild der Krankheit haben. Für diese Genotyp-Phänotyp-Analyse wurden die Patienten der CED-Kohorten 1 und 2 zusammen analysiert. Ausführliche klinische Daten waren von 443 Morbus Crohn-Patienten und 203 Colitis ulcerosa-Patienten verfügbar (siehe 2.2). Auch hier werden der Einfachheit halber die Daten des -1237T/C-Polymorphismus nur für -1237C-Träger (Frequenz von -1237CC Homozygoten und -1237CT Heterozygoten zusammen) präsentiert.

	TLR9 –1237C-Träger	NOD2-positiv	–1237C-Träger und NOD2-positiv
Träger total	29,3%	40,1%	13,8%
Alter bei Erstdiagnose			
A1 < 17 Jahre	13/48 (27%)	28/53 (52,8%)	8/48 (16,7%) n.s.
A2 zwischen 17 und 40 Jahren	96/320 (30,0%)	134/358 (37,4%)	45/320 (14,1%) n.s.
A3 > 40 Jahre	14/56 (25%)	23/62 (37,1%)	5/55 (9,1%) n.s.
Krankheitslokalisation			
L1 Ileum	15/57 (26,3%)	27/60 (45,0%)	8/57 (14,0%) n.s.
L2 Kolon	28/75 (37,3%)	21/83 (25,3%)	7/75 (9,3%) n.s.
L3 Ileum und Kolon	84/304 (27,6%)	145/336 (43,2%)	44/302 (14,6%) n.s.
L4 isoliert oberer Gastrointestinaltrakt	1/2	2/3	1/2 n.s.
Ileumbefall gesamt	99/361 (27,4%)	172/396 (43,4%)	52/359 (14,5%) n.s.
Kolonbefall gesamt	112/379 (29,6%)	166/419 (39,6%)	51/377 (13,5%) n.s.
Oberer Gastrointestinaltrakt gesamt	10/49 (20,4%)	17/59 (28,8%)	3/47 (6,4%) n.s.
Krankheitsverlauf			
B1 inflammatorischer Subtyp	28/96 (29,2%)	38/103 (36,9%)	7/90 (7,8%) n.s.
B2 stenosierender Subtyp	25/109 (22,9%)	47/120 (39,2%)	12/105 (11,4%) n.s.
B3 fistelnder Subtyp	74/230 (32,2%)	109/256 (42,6%)	40/223 (17,9%) p=0,024
Fisteln und Stenosen	75/272 (27,6%)	133/298 (44,6%)	44/271 (16,2%) n.s.
OP	63/214 (29,4%)	109/234 (46,6%)	38/213 (17,8%) p=0,037

Tabelle 3.13 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für den –1237T/C-Polymorphismus in TLR9, NOD2-Mutationen und Kombinationen bei MC-Patienten

Insgesamt wurde in keiner phänotypischen Morbus Crohn-Untergruppe eine signifikante Assoziation mit dem -1237T/C-Polymorphismus gefunden (siehe Tabelle 3.15). Bzgl. der Lokalisation der Erkrankung war die -1237C-Trägerfrequenz bei Patienten mit isoliertem Kolonbefall (L2: 37,3%) höher als im Vergleich zu Patienten mit isoliertem Ileumbefall (L1: 26,3%) oder Befall von Ileum und Kolon (L3: 27,6%). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Betrachtet man das Krankheitsverhalten, so wurde die höchste -1237C-Trägerfrequenz bei fistulierender Krankheit (B3: 32,2%) beobachtet. Auch dieser Anstieg war nicht signifikant im Vergleich zu Patienten mit nicht-stenosierender und nicht-fistulierender Krankheit (B1: 29,2%) oder Patienten mit stenosierendem Krankheitstyp (B2: 22,9%).

Wie schon in anderen Studien bestätigt, so sind auch in dieser Arbeit die NOD2-Mutationen mit einem Diagnosealter unter 17 Jahren, mit Befall des Ileum, dem Vorhandensein von Stenosen und der Notwendigkeit einer Operation assoziiert. Die bedeutsamste Assoziation wurde für NOD2-Mutationen mit einem Befall des Ileum beobachtet. Diese und die Assoziation mit der OP-Notwendigkeit bleiben auch nach der Bonferroni-Korrektur signifikant. Außerdem assoziierte sich das Vorhandensein von zwei mutierten NOD2-Allelen mit einer höheren Frequenz an Fisteln (B3, 75,0% vs. 51,2% im NOD2-Wildtyp, $p_c=0,007$).

Wegen der beschriebenen Interaktionen zwischen dem -1237T/C-Promoterpolymorphismus im TLR9 und NOD2-Mutationen bei Morbus Crohn wurde weiterhin die Kombination aus der -1237C-Variante und NOD2-Mutationen auf Genotyp-Phänotyp-Korrelationen getestet. Dabei wurde eine leichte Assoziation mit dem fistulierenden Krankheitstyp und der Notwendigkeit einer operativen Therapie beobachtet ($p=0,024$ und $p=0,037$). Diese Unterschiede verloren jedoch ihre Signifikanz nach Korrektur für multiple Vergleiche.

Eine signifikante Assoziation für den 2848A/G-Polymorphismus oder für einen der beiden Polymorphismen mit Colitis ulcerosa-Phänotypen wurde nicht beobachtet.

	TLR9 2848A/G-Genotyp			p-Wert
	AA	AG	GG	
Vienna A				
ED < 40 Jahre	102/364 (28,0%)	184/364 (50,5%)	78/364 (21,4%)	n.s.
ED > 40 Jahre	21/61 (34,4%)	31/61 (50,8%)	9/61 (14,8%)	
Montreal A				
A1 ED < 17 Jahre	11/48 (22,9%)	24/48 (50,0%)	13/48 (27,1%)	n.s.
A2 ED zwischen 17 und 40 Jahre	93/321 (29,0%)	161/321 (50,2%)	67/321 (20,9%)	
A3 ED > 40 Jahre	19/56 (33,9%)	30/56 (53,6%)	7/56 (12,5%)	
Vienna L				
Ileum isoliert	15/51 (29,4%)	24/51 (47,1%)	12/51 (23,5%)	n.s.
Kolon isoliert	26/69 (37,7%)	36/69 (52,2%)	7/69 (10,1%)	
Ileum und Kolon	83/269 (30,9%)	131/269 (48,7%)	55/269 (20,4%)	
Oberer GI-Trakt	12/49 (24,5%)	22/49 (44,9%)	15/49 (30,6%)	
Vienna B				
Inflammatorisch	27/96 (28,1%)	44/96 (45,8%)	25/96 (26,0%)	n.s.
Stenosierend	39/109 (35,8%)	47/109 (43,1%)	23/109 (21,1%)	
Fistulierend	70/231 (30,3%)	121/231 (52,4%)	40/231 (17,3%)	
Operationen	63/215 (29,3%)	114/215 (53,0%)	38/215 (17,7%)	n.s.

Tabelle 3.14 Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für den 2848A/G-Polymorphismus

3.5 TLR9-mRNA-Expression in der Darmmukosa

3.5.1 TLR9-mRNA-Expression in verschiedenen Darmabschnitten

Die Expression von TLR9-mRNA wurde in verschiedenen Darmabschnitten (terminales Ileum, rechtes Kolon, linkes Kolon) ermittelt. Ziel war es zunächst, zu überprüfen, ob ein signifikanter Unterschied der Rezeptorenexpression in verschiedenen Darmabschnitten unter entzündungsfreien Bedingungen vorliegt. Dazu wurden nur Darmbiopsien von Patienten sowie Kontrollpersonen ohne klinische, makroskopische oder histologische Zeichen einer aktiven Entzündung verwendet.

Unabhängig von der Diagnose war die Expression von TLR9 im terminalen Ileum dreimal höher als im rechten Kolon ($p=0,002$) und im linken Kolon ($p=0,003$) (siehe Abbildung 3.4). Zwischen dem rechten und linken Kolon wurde kein Expressionunterschied beobachtet.

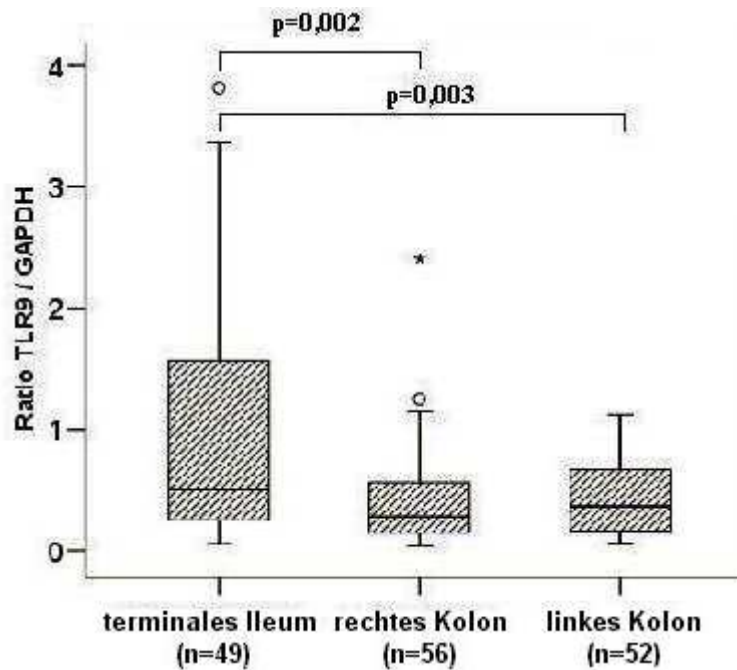


Abbildung 3.6 Allgemeine Expression von TLR9 in den drei verschiedenen Darmabschnitten (untersucht wurden Biopsien von 32 Kontrollpersonen, 39 MC-Patienten und 29 CU-Patienten)

3.5.2 TLR9-mRNA-Expression bei MC und CU-Personen im Vergleich zur Kontrollpopulation

Als zweites sollte untersucht werden, ob unter entzündungsfreien Bedingungen Unterschiede im Expressionsniveau von TLR9-mRNA in der Darmmukosa von MC und CU-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen bestehen. Im Vergleich zu den gesunden Kontrollen war bei den Morbus Crohn-Patienten in allen Darmabschnitten die Expression von TLR9 signifikant niedriger (MC vs. Kontrollen: $p=0,016$ terminales Ileum, $p=0,037$ rechtes Kolon, $p=0,020$ linkes Kolon). Dieser Unterschied war im terminalen Ileum am offensichtlichsten. Bei Colitis ulcerosa-Patienten war die intestinale TLR9-Expression vergleichbar mit der bei den gesunden Kontrollen (CU vs. Kontrollen: $p=0,168$ terminales Ileum, $p=0,832$ rechtes Kolon, $p=0,724$ linkes Kolon). Zwischen Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten war kein signifikanter Unterschied zu beobachten (MC vs. CU: $p=0,664$ terminales Ileum, $p=0,403$ rechtes Kolon, $p=0,162$ linkes Kolon) (siehe Abbildung 3.7-3.9).

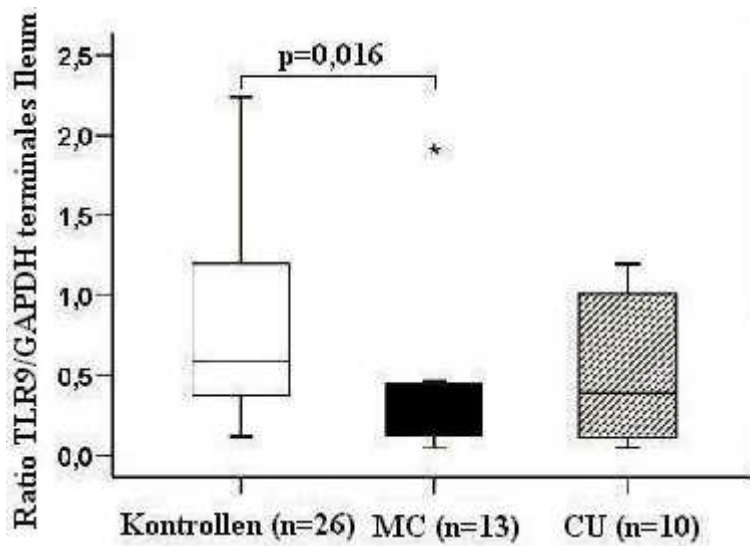


Abbildung 3.7 TLR9-Expression im terminalen Ileum abhängig von der Diagnose

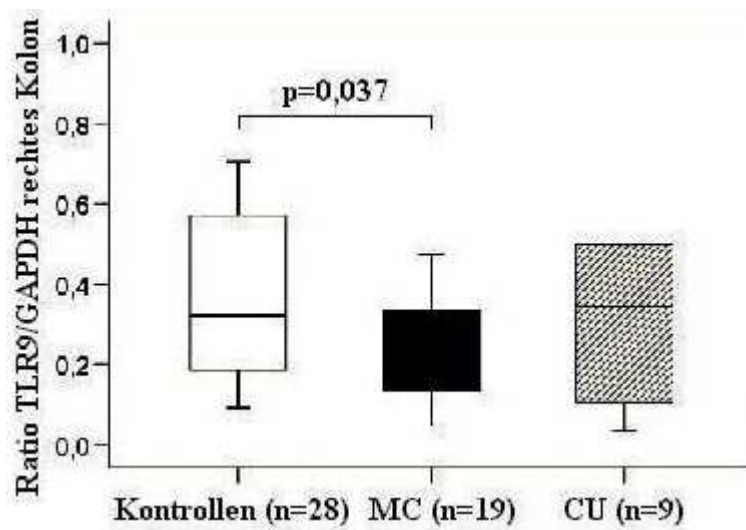


Abbildung 3.8 TLR9-Expression im rechten Kolon abhängig von der Diagnose

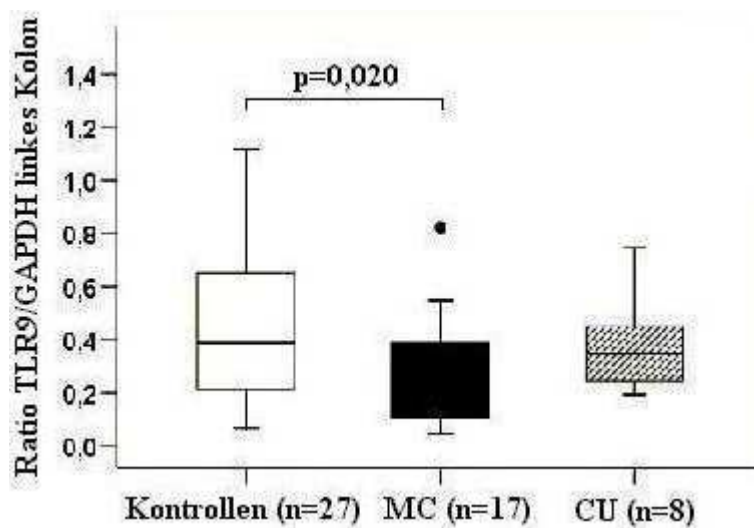


Abbildung 3.9 TLR9-Expression im linken Kolon abhängig von der Diagnose

3.5.3 Einfluss einer aktiven Entzündung auf die TLR9-mRNA-Expression bei MC und CU

Desweiteren wurde untersucht, ob die TLR9-mRNA-Expression bei intestinaler Entzündung reguliert wird. Dafür wurde die TLR9-Expression in Biopsien von Patienten mit aktiver CED verglichen. Von jedem der Patienten wurden Gewebeproben von makroskopisch (endoskopisch sichtbar) entzündlich-veränderten und nicht-entzündlich-veränderten Mukosaarealen entnommen. Insgesamt wurde kein signifikanter Unterschied im TLR9-mRNA-Expressionsniveau zwischen entzündlich-veränderter und nicht-entzündlich-veränderter Mukosa beobachtet ($p=0,600$, $n=25$).

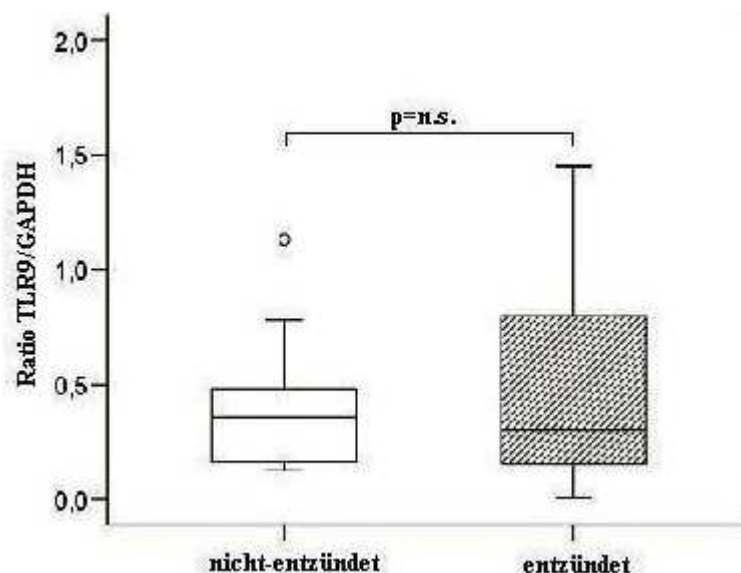


Abbildung 3.10 TLR9-Expression in nicht-entzündetem und entzündetem Gewebe

3.5.4 Einfluss des Genotyps und klinischen Phänotyps auf die TLR9-mRNA-Expression

Nach Aufteilung der Individuen abhängig vom TLR9-1237-Genotyp und NOD2-Status wurde kein signifikanter Unterschied der TLR9-Expression zwischen Trägern der -1237C-Varianten und dem TLR9-Wildtyp (TLR9-wt vs. TLR9-C-Träger: $p=0,632$ terminales Ileum $n=24/8$, $p=0,950$ rechtes Kolon $n=32/9$, $p=0,319$ linkes Kolon $n=29/8$) oder zwischen Individuen mit NOD2-Wildtyp und mutierten NOD2 gefunden (NOD2-wt vs. NOD2-mutiert: $p=0,687$ terminales Ileum $n=19/13$, $p=0,242$ rechtes Kolon $n=32/9$, $p=0,665$ linkes Kolon $n=22/15$).

Eine Korrelation der TLR9-mRNA-Expression zur phänotypischen Klinik konnte nicht nachgewiesen werden.

	terminales Ileum	rechtes Kolon	linkes Kolon
keine Fistel vs. Fistel	p=0,617 n=1/6	p=1,000 n=2/7	p=0,197 n=3/6
keine Stenose vs. Stenose	p=0,245 n=2/5	p=0,655 n=3/5	p=0,077 n=4/3
keine Ileozökalresektion vs. Ileozökalresektion	p=0,180 n=5/3	p=0,144 n=5/6	p=0,273 n=5/6

Tabelle 3.15 Korrelation der TLR9-mRNA-Expression zur phänotypischen Klinik

4. Diskussion

4.1 Studiendesign und Methoden

4.1.1 Assoziationsstudien

Bei komplexen genetischen Krankheiten multifaktorieller Genese wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist es schwierig, einen bestimmten Krankheitssuszeptibilitätslocus zu identifizieren. Um genetische Ursachen für diese Krankheiten herauszufinden, gibt es zwei etablierte Untersuchungsstrategien, nämlich Kopplungsstudien und Assoziationsstudien. In genetischen Kopplungsstudien können mittels genetischer Marker innerhalb von Familien mit mehr als einem betroffenen Mitglied krankheitsrelevante Loci typisiert werden (siehe 1.4.1). Solche genomweiten Scans können aber nur relativ große Bereiche mit hunderten von Genen identifizieren. Mit Hilfe von Assoziationsstudien können bestimmte Genvarianten in sog. Kandidatengenen auf eine Assoziation für eine Krankheit überprüft werden (Bonen 2003a, Taylor 2001).

In der hier vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Assoziationsstudie. Assoziationsstudien sind Fall-Kontroll-Studien. Sie werden benutzt, um Korrelationen zwischen der Frequenz von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms = SNPs) und der Krankheitsentstehung oder anderen Aspekten einer bestimmten Krankheit wie der Schweregrad oder der Progression zu entdecken (Twyman 2003, Tabor 2002). Dazu werden Unterschiede von Allel- und Genotypfrequenzen eines Kandidatengens in Patienten im Vergleich zu Kontrollindividuen untersucht. Wenn eine Assoziation mit einem bestimmten Allel gefunden wird, lässt dies an eine kausale Beziehung denken (Taylor 2001, Bonen 2003a).

SNPs sind DNA-Sequenzvariationen, welche durch Mutationen wie Insertion, Deletion oder einfachen Basenaustausch entstanden sind. Dabei können an einer Position im Genom verschiedene Nukleotide stehen (Stoneking 2001). Diese Sequenzalternativen werden auch Allele genannt. Meistens gibt es nur zwei Allele (=biallelisch) eines SNPs. Sie können aber auch tri- oder tetraallelisch sein. Definitionsgemäß muss das seltenere Allel eine Frequenz von 1% in der Population aufweisen, damit sie sich von seltenen Sequenzvariationen unterscheiden. Die Häufigkeit der SNPs ist je nach genomischer Region und Population verschieden. Im

Schnitt schätzt man, dass ein SNP auf 200-600 Basenpaare kommt und mindestens 93% aller Gene betroffen sind (Tsalenko 2003, Twyman 2003).

Nicht jeder SNP kann in Assoziationsstudien effektiv untersucht werden. Es ist zu unterscheiden, ob der SNP in kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen liegt. Am besten sind SNPs in kodierenden Regionen geeignet, welche die Sequenz des kodierten Proteins verändern. Aber auch SNPs in nicht-kodierenden Regionen, nämlich wenn sie in genregulierenden Segmenten wie der Promoterregion liegen und damit die Expression der mRNA beeinträchtigen, kommen für solche Untersuchungen in Frage (Chakravarti 2001). Außerdem ist zu beachten, dass manche SNPs nur in bestimmten Populationen z.B. bei Europäern mit erhöhter Frequenz gefunden werden. D.h. Kontroll- und Patientengut sollten von derselben Herkunft sein, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu stärken (Stoneking 2001).

In dieser Studie wurden zwei Polymorphismen im TLR9-Gen untersucht. TLR9 ist Mitglied des angeborenen Immunsystems und Rezeptor für bakterielle unmethylierte CpG-DNA. Da die bakterielle Darmflora eine bedeutende Rolle in der Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen hat, kann dieses Gen durchaus ein mögliches Kandidatengen für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sein.

Der -1237C/T-Polymorphismus befindet sich in der genregulierenden Promoterregion des Gens und der 2848A/G-Polymorphismus in der für das Protein kodierenden Region, führt aber zu keinem Aminosäureaustausch.

Leider ist die Aussagekraft einzelner einfacher Assoziationsstudien zur Entdeckung genetischer Varianten nur gering, wenn die Ergebnisse nicht in anderen Studien repliziert und bestätigt werden können. Das kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen kann die Struktur der Populationen nicht übereinstimmen. Dabei kann unter den einzelnen Gruppen eine genetische Variabilität vorherrschen. Aufgrund der Allelheterogenität dominieren in verschiedenen Populationen verschiedene Allele und somit variieren auch die Allelfrequenzen, was sich v.a. bei schwächeren genetischen Einflussfaktoren bemerkbar macht. Außerdem kann ein Kopplungsungleichgewicht vorliegen, d.h. die gefundene Assoziation ist nicht auf das krankheitsrelevante Allel sondern auf ein in der Nachbarschaft gelegenes Allel zurückzuführen, mit dem es gekoppelt vererbt wird. Schwierigkeiten in der Assoziationsfindung können auch bestehen, wenn viele genetische Interaktionen vorliegen, was bei so komplexen Krankheiten wie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nicht selten ist. Desweiteren können falsche Assoziationen durch Missklassifikation und nicht einheitlicher statistischer Tests entstehen (Colhoun 2003, Gorroochurn 2007, Ioannidis 2007).

Deshalb sollte bei Design und Analyse der Ergebnisse sorgfältig gehandelt werden. Besonders die Auswahl und Größe der Populationen ist wichtig. Die getesteten Personen – Patienten und Kontrollindividuen – sollten gleicher ethnischer Herkunft sein und gleiches Geschlechterverhältnis aufweisen. In Populationen mit ähnlichem genetischen Hintergrund und ähnlicher Krankheitsrate ist z.B. ein Heterogenitätseffekt eher unwahrscheinlich. Die Größe sollte nicht zu klein sein, damit auch schwächere Assoziationen entdeckt werden. Zur Bestätigung anderer Assoziationen sollte die Population mindestens genauso groß sein, wie die Ursprungspopulation. Im Gegenzug sollte die Kontrollpopulation gleich bis zweimal so groß sein, um falsch-positive und falsch-negative Assoziationsergebnisse zu vermeiden. Auch Missklassifikationen der Krankheitsbilder mit falscher Zuordnung zu den einzelnen Gruppen können durch standardisierte diagnostische Kriterien verhindert werden. Die verwendeten Methoden müssen zuverlässig sein, um den methodischen Fehler so klein wie möglich zu halten. Die Analyse der Daten erfolgt nach standardisierten statistischen Tests, wobei bei Mehrfachtestungen häufig eine Korrektur des p-Wertes vorgenommen werden muss (Colhoun 2003, Zhang 2007).

Insgesamt wurden in dieser Studie 606 Morbus Crohn-Patienten, 350 Colitis ulcerosa-Patienten und 792 Kontrollpersonen untersucht. Alle waren kaukasischer Herkunft und nach Alter und Geschlechter gleich verteilt. Die Diagnosestellung und Klassifizierung der Krankheiten wurde nach den gängigen medizinischen Standards vorgenommen (Nayar 2004, Viscido 2005, Stange 2006, Satsangi 2006). Die Genotypfrequenzen wurden alle mit den nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erwarteten Frequenzen verglichen, wobei keine Abweichungen beobachtet werden konnten und somit keine systematischen Fehler anzunehmen waren. Außerdem wurde bei Mehrfachtestungen der p-Wert entsprechend korrigiert.

4.1.2 Auswahl und Validität der Methoden

Die Auswahl der Methoden ist nach dem Studiendesign zur Durchführung einer Assoziationsstudie das nächste wichtige Handwerkszeug. Die Methoden müssen zuverlässig sein, damit alle Allele der untersuchten Polymorphismen sicher und zweifelsfrei identifiziert werden können. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Auswahl: allelspezifische PCR, Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)- Analyse, DNA-Sequenzierung, Hybridisierungstechniken mit Fluoreszenzdetektierung und Einzelstrangkonnformationspolymorphismus (singlestrand conformational polymorphism = SSCP)- Analyse (Twyman 2003). Zur Genotypisierung der TLR9-Polymorphismen wurde in dieser Studie die RFLP-Analyse verwendet. Für

die NOD2-Typisierung wurde zum einen die RFLP-Analyse und zum anderen die Hybridisierungssondentypisierung genutzt. Die RFLP-Analyse ist eine der ältesten und am häufigsten gebräuchlichen Genotypisierungsmethoden. Ihr Prinzip beruht darauf, dass Restriktionsendonukleasen bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und schneiden, welche bei Vorhandensein nur eines Allels bestehen. So entstehen verschieden lange DNA-Fragmente, wonach der jeweilige Genotyp zugeordnet werden kann (siehe 2.6). Die Hybridisierungssondentypisierung erfolgt nach dem Grundsatz des Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfers (FRET). Dabei kommen zwei Sonden zum Einsatz, welche an den zu untersuchenden DNA-Abschnitt binden und, je nachdem welcher SNP vorhanden ist, verschieden stark fluoreszieren (Gibson 2006) (siehe 2.8). Beides sind sehr zuverlässige Methoden zur Genotypisierung, da die Restriktionsenzyme nur bestimmte Sequenzen spezifisch erkennen und die Hybridisierungssonden so konzipiert sind, dass sie nur an spezifische Sequenzen binden. In einer Studie wurden beide Genotypisierungsmethoden miteinander verglichen. Die Konkordanz lag dabei bei 100% (Schroell-Metzger 2003, Gibson 2006). Fehlerquelle in der RFLP-Analyse kann sein, dass unter extremen Bedingungen die Spezifität für Restriktionsenzyme herabgesetzt ist. Das ist aber nur der Fall, wenn z.B. hohe Glycerol-, niedrige Salzkonzentrationen oder organische Lösungsmittel vorhanden sind. Da in dieser Arbeit solche Bedingungen nicht herrschten und nur Puffer des Herstellers verwendet wurden, kann dies ausgeschlossen werden. Außerdem wurden als Kontrolle in jeder Untersuchung immer Proben mit verwendet, deren Genotyp bekannt war, um Fehltypisierungen zu vermeiden. Desweiteren können die Genotypfrequenzen in der Kontrollpopulation mit anderen Frequenzen in Populationen ähnlicher ethnischer Herkunft verglichen werden.

4.2 Bedeutung der Ergebnisse aus genetischer Sicht

4.2.1 Frequenz der Polymorphismen und Vergleich zu anderen Daten aus der Literatur

Wie bereits oben erwähnt, ist für Design und Validität zur Durchführung und Replizierung von Assoziationsstudien die gleiche ethnische Herkunft der untersuchten Individuen mit Vergleichbarkeit zu anderen Studien und das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts von besonderer Wichtigkeit. Die Allelfrequenzen in der Kontrollpopulation wurden mit den Frequenzen, welche in anderen Studien ermittelt worden sind, verglichen.

Die Frequenz des selteneren C-Allels des -1237C/T-Polymorphismus liegt in der kaukasischen Bevölkerung zwischen 10 und 16 %. Die Frequenz in der eigenen Kontrollpopulation ist mit 13,2 % mit den in anderen deutschen Studien ermittelten Frequenzen des C-Allels 10 und 13,8 % durchaus vergleichbar. Die Frequenz in asiatischen Populationen liegt dagegen nur bei 0,3 und 0,6%. Daran kann man erkennen, dass der ethnische Ursprung einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der Assoziationsstudie haben kann. Ursache dieses ethnischen Unterschieds kann die räumliche Trennung mit von einander unabhängiger Evolution sein. In der ursprünglichen Studie von Lazarus et al. (Lazarus 2003) wurde eine gemischte Bevölkerung untersucht. Im Durchschnitt lag die Frequenz des C-Allels bei 16% und damit vergleichbar mit anderen kaukasischen Populationen. Aufgeteilt auf die einzelnen Bevölkerungsgruppen zeigt sich aber eine Spanne von 4-25 %.

TLR9-Polymorphismen	Frequenz der selteneren Allele in der eigenen Kontrollpopulation n=792	Daten aus der Literatur		
		Allelfrequenzen für die selteneren Allele und Herkunft der getesteten Personen	Anzahl der getesteten Individuen	Referenz
-1237T/C	0,132	0,154 (New Zealand)	188	Hong 2007
		0,16 (USA, all combined)	71	Lazarus 2003
		0,25 (African American)	24	
		0,15 (European)	23	
		0,04 (Hispanic)	24	
		0,003 (Korea)	350	Hur 2005
		0,16 (Italien)	224	Lammers 2005
		0,10 (Deutschland)	252	Novak 2007
		0,006 (China)	799	Ng 2005
		0,138 (Deutschland)	527	Berghöfer 2005
2848A/G	0,42	0,49 (USA, all combined)	71	Lazarus 2003
		0,33 (African American)	24	
		0,57 (European)	23	
		0,60 (Hispanic)	24	
		0,60 (Italien)	224	Lammers 2005
		0,33 (Deutschland)	252	Novak 2007
		0,554 (Deutschland)	527	Berghöfer 2005

Tabelle 4.1 Allelfrequenzen der TLR9-Polymorphismen in anderen Kontrollpopulationen im Vergleich zur eigenen Kontrollpopulation

Für den 2848A/G-Polymorphismus liegt die Frequenz des selteneren G-Allels unter Kaukasiern zwischen 33 und 60 %. In der eigenen Kontrollpopulation lag die Frequenz bei 42 % und war somit mit der Häufigkeit in anderen deutschen Studien vergleichbar (33 und 55,4 %). Beispiele für Populationen anderer Herkunft konnten nicht gefunden werden, sodass kein ethnischer Vergleich vorliegt.

4.2.2 Frequenz der Polymorphismen bei CED-Patienten

Das TLR9-Gen ist auf Chromosom 3p21.3 in der Nähe einer Kopplungsregion für CED lokalisiert (Chuang 2000, Du 2000, Duerr 2002, Hampe 2001a). Damit ist das TLR9-Gen ein potentiell Kandidatengen für CED. In einer Initialstudie unseres Arbeitskreises wurden die beiden TLR9-Polymorphismen -1237T/C und 2848A/G bei CED-Patienten und Kontrollpersonen untersucht (Török 2004b). Im Falle des -1237C/T-Polymorphismus waren sowohl die Allelfrequenz des mutierten C-Allels als auch der C-Träger-Status bei Morbus Crohn-Patienten signifikant im Vergleich zur Kontrollpopulation erhöht (19,3 % vs. 11,9 %, $p = 0,0036$ bzw. 34,5 % vs. 22,6 %, $p = 0,0093$). Die Häufigkeitsverteilungen in der Colitis ulcerosa – Gruppe zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe nur minimale Abweichungen, die aber statistisch nicht signifikant waren. Für den 2848A/G-Polymorphismus wurden keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung zwischen Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und den Kontrollen gefunden. Nur die Frequenz des 2848AG-Genotyps zeigte bei den Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine leichte Erniedrigung (43,1% vs. 54%, $p = 0,0328$). Zur Bestätigung der ursprünglich beschriebenen Assoziation (Török 2004b) wurden nun zwei weitere Populationen (n1: 287 MC, 110 CU ;n2: 145 MC, 102 CU; 527 Kontrollen) untersucht. Es konnte aber hier kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des -1237T/C-Polymorphismus bei den Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zur Kontrollpopulation nachgewiesen werden. Auch für den zweiten Polymorphismus konnten weder innerhalb der Allelfrequenzen noch innerhalb der Genotypfrequenzen signifikante Unterschiede nachgewiesen werden.

Obwohl alle Rahmenbedingungen zur Durchführung der Studie optimal gegeben waren und alle Patienten- und Kontrollpopulationen bzgl. Größe und ethnischer Herkunft miteinander vergleichbar waren, konnte die vorbeschriebene Assoziation nicht bestätigt werden. Grund für diese Nichtbestätigung könnte sein, dass die Mitwirkung von TLR9-Polymorphismen an der Entstehung von CED komplexer ist und auf genetischen Interaktionen beruht, die nicht so direkt messbar sind, oder dass die Mutationen im TLR9-Gen nur einen relativ schwachen Ein-

fluss auf die Entstehung von CED haben und die bisherige Assoziation in einem deutlich grösseren Kollektiv überprüft werden muss.

4.2.3 Interaktionen mit NOD2-Mutationen bei Morbus Crohn-Patienten

Das Pathogenitätsmodell der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beruht auf einer multifaktoriellen Genese. Bisher gibt es viele Beweise, dass die intestinale Mikroflora eine wichtige Rolle in der Aktivierung und Aufrechterhaltung einer Kolitis spielt und dass die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen von Komponenten des angeborenen Immunsystems reguliert werden (Hugot 1999, Korzenik 2000, Lakatos 2006, Satsangi 2003, Sartor 2006). Für Morbus Crohn scheint eine beeinträchtigte bakterielle Erkennung ein maßgeblicher Defekt zu sein, wie die Assoziation mit Mutationen im NOD2-Gen zeigt (Hugot 2001, Economou 2004). Das Vorhandensein der NOD2-Mutationen ist aber weder notwendig noch ausreichend für die Entwicklung von Morbus Crohn. Deshalb könnten auch Variationen anderer Rezeptoren des angeborenen Immunsystems an der genetischen Suszeptibilität für Morbus Crohn beteiligt sein.

Einige funktionelle Studien haben bereits gezeigt, dass die Morbus Crohn-assoziierten Varianten von NOD2 die synergistischen Effekte von NOD2 mit anderen pattern recognition receptors beeinträchtigen (van Heel 2005a, Traub 2004, Yang 2001). Van Heel und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die NOD2-Stimulation normalerweise die Immunantwort auf CpG DNA erhöht. Diese synergistischen Effekte zwischen NOD2 und TLR9 gehen in Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen verloren (van Heel 2005b). Auch die Koexpression von TLR9 (Rumio 2004) und NOD2 (Lala 2003) eng zu den Sekretionsgranula im intrazellulären Kompartiment der Paneth Zellen lässt annehmen, dass Signale über NOD2 und TLR9 für effiziente bakterielle Bekämpfung im Darm notwendig sind, und dass möglicherweise Interaktionen zwischen den beiden Rezeptoren stattfinden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der -1237T/C-Polymorphismus mit Morbus Crohn assoziiert ist bei Patienten, die Risiko-assoziierte Varianten in NOD2 tragen. Die Frequenz der -1237C-Träger (Genotypen -1237TC und -1237CC) war um 10% höher bei Patienten mit wenigstens einer Morbus Crohn-assoziierten Variante von NOD2 im Vergleich zu Wildtyp-Patienten und Kontrollen. Dieser Effekt war dosis-abhängig, d.h. das Krankheitsrisiko stieg bei Anwesenheit der -1237C-Variante und zwei mutierten NOD2-Allelen weiter an (homozygot und compound heterozygot). Bei diesen Patienten war die -1237C-Trägerfrequenz 44,3 % im Vergleich zu 23,6% in Wildtyp-Patienten und 20 % bei den Kontrollen. Die beschriebene Assoziation ist von größter Wichtigkeit, weil es der erste gene-

tische Beweis für Interaktionen zwischen TLR9 und NOD2- Mutationen darstellt, welche die vorher beschriebenen synergistischen Effekte zwischen NOD2 und TLR9 ergänzt (van Hell 2005). Das Vorkommen des –1237T/C-Polymorphismus im TLR9-Gen scheint das Krankheitsrisiko auf eine bisher unbekannte Art und Weise zusätzlich bei diesen Patienten steigen zu lassen.

In der initialen Studie war der Prozentsatz an NOD2-Mutationen bei Morbus Crohn-Patienten (45,1%) deutlich höher als in den jetzt untersuchten Populationen (39,3%). Da NOD2- und TLR9-Mutationen gehäuft zusammen bei Morbus Crohna auftreten, war somit auch der Prozentsatz der TLR9-Mutationen erhöht. Deshalb konnte ein signifikant höherer Anteil an –1237C-Trägern festgestellt und eine Assoziation zu Morbus Crohn beschrieben werden.

4.3 Bedeutung der Ergebnisse aus funktioneller Sicht

Die drei grundlegendsten Faktoren in der Ätiologie und Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sind die Umwelt, genetische Prädisposition und das angeborene Immunsystem. Bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa ist die mukosale Homöostase aus dem Gleichgewicht geraten. Eine Beeinträchtigung der bakteriellen Erkennung durch die pattern recognition receptors kann durch genetische Mutationen bedingt sein (Cho 2007). Die ersten funktionell relevanten Mutationen, welche mit MC assoziiert worden sind, wurden in dem pattern recognition receptor NOD2 gefunden. Durch diese Mutationen wird die NF-κB-Aktivierung als Antwort auf Kontakt mit bakteriellem MDP zur bakteriellen Bekämpfung gestört. Auch genetische Variationen anderer Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie z.B. Toll-like Rezeptoren könnten an der genetischen Suszeptibilität für CED beteiligt sein. Für den Toll-like Rezeptor 4 sind schon Assoziationen von loss-of-function Mutationen mit CED und signifikante Interaktionen zwischen diesen Varianten und den Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Mutationen beschrieben worden (Browning 2007, Gazouli 2005, Franchimont 2004, Török 2004a).

Das Gen für TLR9 ist in der Nähe einer Kopplungsregion für CED lokalisiert (Duerr 2002, Hampe 2001a). Die TLR9-Funktion liegt in der Erkennung von bakterieller CpG-DNA, was eine spezielle Rolle in der Modulation von Darmkrankheiten zu haben scheint. Die Gabe von CpG-DNA verschlimmert eine bereits etablierte Kolitis, in TLR9-defekten Mäusen zeigt sich aber nach Induktion einer Kolitis eine signifikant niedrigere intestinale Entzündung als in Wildtyp-Mäusen (Obermeier 2002, 2005). Andererseits wirken im Mausmodell verabreichte

CpG-DNA-Motive prophylaktisch auf nachfolgend induzierte Koliden, indem die Schwere der Erkrankung abgemildert und die Zytokin-vermittelte Entzündung begrenzt wird (Obermeier 2003, Rachmilewitz 2002). Dieser protektive antiinflammatorische Effekt probiotischer Bakterien scheint durch TLR9 vermittelt zu sein (Rachmilewitz 2004). TLR9 wird außer in immunologischen Zellen auch in Paneth Zellen exprimiert. Die systemische Gabe von CpG-DNA-Motiven führt in Mäusen zur Degranulation von Paneth Zellen und zur Freisetzung von antibakteriellen Proteinen (Rumio 2004). Wegen der vielen molekularen Bestandteile (PAMPs) eines mikrobiellen Pathogens sind an der Aktivierung des angeborenen Immunsystems viele PRRs über komplexe Interaktionen untereinander beteiligt. Van Heel und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass die NOD2-Stimulation normalerweise die Immunantwort auf CpG-DNA erhöht. Dieser synergistische Effekt zwischen NOD2 und TLR9 geht in Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen verloren (van Heel 2005b). Außerdem wird neben TLR9 auch NOD2 nahe der sekretorischen Granula im intrazellulären Kompartiment der Paneth Zellen exprimiert (Rumio 2004, Lala 2003). Das lässt vermuten, dass zwei Signalwege über NOD2 und TLR9 zur effizienten bakteriellen Bekämpfung im Darm notwendig sind. Damit ist TLR9 sowohl genetisch als auch funktionell als Kandidatengen für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa geeignet. Im Gegensatz zu den risikoassoziierten Varianten von NOD2 ist eine funktionelle Relevanz für TLR9-Polymorphismen bisher nicht bekannt. Die hier untersuchten Polymorphismen wurden für die Analyse ausgewählt, weil sie die vier häufigsten TLR9-Haplotypen in Kaukasiern unterscheiden können (Lazarus 2003). Initial wurde in einer ersten Untersuchung eine signifikante Assoziation zwischen Morbus Crohn und dem -1237T/C-Promotorpolymorphismus gefunden (Török 2004b). Um diese Assoziation zu überprüfen, wurden zwei weitere von einander unabhängige Populationen untersucht und auf spezifische Assoziationen mit einem Krankheitstyp und genetische Interaktionen mit NOD2-Mutationen getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass der -1237T/C-Polymorphismus mit Morbus Crohn bei Patienten assoziiert ist, die auch Risiko-assoziierte Varianten in NOD2 tragen. Die Frequenz der -1237C-Träger (Genotypen -1237TC und -1237CC summiert) war um 10 % bei Patienten mit wenigstens einer Morbus Crohn-assoziierten Variante im NOD2 erhöht im Vergleich zu Wildtyp-NOD2-Patienten und Kontrollen. Dieser Effekt war dosis-abhängig, d.h. das Krankheitsrisiko stieg bei Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen (homozygot und compound heterozygot) in Verbindung mit dem -1237C-Allel weiter an. Bei diesen Patienten war die -1237C-Trägerfrequenz 44,3% im Vergleich zu 23,6 % in Wildtyp-Patienten und 20 % bei den Kontrollen. Dies scheint der erste genetische Beweis für Interaktionen zwischen TLR9 und

NOD2-Mutationen zu liefern, welche die vorher beschriebenen synergistischen Effekte einer NOD2 und TLR9-Stimulation ergänzen (van Hell 2005).

Für den 2848A/G-Polymorphismus ist eine Assoziation des 2848 AA-Genotyps in TLR9 mit einer erhöhten Genexpression und höheren Frequenz von intrazellulärer IgM+ B-Zellen gefolgt von CpG-Stimulation beschrieben (Kikuchi 2005). Dieser Polymorphismus war in unserer Population nicht mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert.

Die Lokalisation des -1237T/C-Polymorphismus in der Promotorregion des Gens impliziert mögliche Effekte auf die Genregulierung und -expression. Eine erste Studie über die TLR9-mRNA-Expression in intestinalen Epithelzellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigte gleiche Expressionslevel in Kolonmukosa sowohl bei Kontrollen (n=6) als auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn (n=13) (Pedersen 2005). Eine Stratifizierung der Individuen in Bezug auf den TLR9-Genotyp wurde nicht durchgeführt. In der hier durchgeführten Untersuchung war unabhängig von der Diagnose die Expression von TLR9-mRNA im terminalen Ileum dreimal höher als im rechten und linken Kolon. Nach Aufteilung in die Krankheitstypen war bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen in allen Darmabschnitten unter entzündungsfreien Bedingungen, v.a. im terminalen Ileum, die TLR9-Expression signifikant niedriger. Da Morbus Crohn hauptsächlich im terminalen Ileum lokalisiert ist, lässt dies eine Beteiligung von TLR9 in der Pathogenese vermuten. Im Vergleich von entzündeter zu nicht-entzündeter Mukosa bei CED-Patienten ließ sich kein signifikanter Unterschied nachweisen. Nach Stratifizierung in Abhängigkeit vom TLR9- und NOD2-Genotyp wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Insgesamt scheint der -1237T/C-Polymorphismus im TLR9-Gen das Krankheitsrisiko von Morbus Crohn bei Individuen mit mutiertem NOD2 zusätzlich steigen zu lassen. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese eines gestörten cross-talk zwischen verschiedenen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems als einen wichtigen Schritt in der Pathogenese der Erkrankungen.

5. Zusammenfassung

Unter dem Begriff chronisch entzündliche Darmerkrankungen werden die zwei Krankheitsbilder Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zusammengefasst. Kennzeichnend für beide Krankheiten ist eine chronisch unkontrollierte Entzündung der intestinalen Mukosa unterschiedlicher Ausprägung und Manifestation. In der Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen spielen drei Komponenten eine wichtige Rolle: genetische Prädisposition, die Umwelt und das mukosale Immunsystem. Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegt die mukosale Homöostase im Ungleichgewicht. Die Erkennung von bakteriellen Bestandteilen durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ist möglicherweise gestört. Ein wichtiger Beweis dafür ist die bekannte Assoziation von Mutationen des NOD2-Gens mit Morbus Crohn. Auch Toll-like-Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle im angeborenen Immunsystem und sind somit potentielle Kandidaten in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob TLR9 durch genetische Assoziation genauso in der Entstehung dieser Erkrankungen eine Rolle spielt. Dafür wurden zwei Polymorphismen im TLR9-Gen hinsichtlich einer Assoziation zu einem Phänotyp, auf Interaktionen mit NOD2-Mutationen und Expressionsunterschiede der TLR9-mRNA in verschiedenen Darmabschnitten hin untersucht.

Insgesamt wurden 606 Patienten mit Morbus Crohn, 350 Patienten mit Colitis ulcerosa und 792 gesunde Kontrollindividuen auf Polymorphismen im TLR9-Gen getestet. Das Gen für TLR9 ist in der Nähe eines Suszeptibilitätslocus für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa lokalisiert und für die Erkennung von bakteriellen CpG DNA-Motiven verantwortlich. Funktionelle Studien haben gezeigt, dass eine NOD2-Stimulation normalerweise die Immunantwort auf CpG DNA erhöht. Dieser synergistische Effekt zwischen NOD2 und TLR9 geht in Patienten mit doppelter NOD2-Mutation verloren (van Heel 2005b). Auch die Koexpression von TLR9 (Rumio 2004) und NOD2 (Lala 2003) eng zu den Sekretionsgranula im intrazellulären Kompartiment der Paneth Zellen lässt annehmen, dass Signale über NOD2 und TLR9 für effiziente bakterielle Bekämpfung im Darm notwendig sind. Zum einen wurde der Promotorpolymorphismus -1237T/C und zum anderen der 2848A/G-Polymorphismus untersucht. Im Gegensatz zur Initialstudie (Török 2003b) konnte im Falle des -1237T/C-Polymorphismus keine signifikante Erhöhung der Häufigkeit der C-Variante bei Morbus Crohn-Patienten im Vergleich zur Kontrollpopulation nachgewiesen werden.

Es zeigten sich hier jedoch signifikante Interaktionen zwischen dem Promoterpolymorphismus und NOD2-Mutationen bei Patienten mit Morbus Crohn. Die Zahl der Individuen mit mindestens einer Morbus Crohn-assoziierten Variante von NOD2 und gleichzeitig der -1237C-Variante (Genotypen -1237TC und -1237CC) war im Vergleich zu Wildtyp-Patienten und Kontrollpersonen um 10% erhöht. Das Morbus Crohn-Risiko stieg bei Anwesenheit der -1237C-Variante bei Patienten mit doppelter Mutation im NOD2-Gen (homozygot und compound heterozygot) noch weiter an. Unter diesen Patienten war die -1237C-Trägerfrequenz 44,3 % im Vergleich zu 23,6 % in Wildtyp-Patienten und 20% bei den Kontrollen. Diese beobachtete Assoziation ist ein weiterer Beweis für Interaktionen zwischen TLR9 und NOD2-Mutationen, welcher die vorher beschriebenen synergistischen Effekte zwischen NOD2 und TLR9 ergänzt (van Hell 2005).

In der TLR9-mRNA-Expressionsanalyse zeigte sich eine dreifach höhere Expression im terminalen Ileum als im rechten und linken Kolon. Bei Morbus Crohn-Patienten war diese in allen Darmabschnitten, aber v.a. im terminalen Ileum signifikant niedriger als bei den Kontrollpersonen ($p=0,016$ term. Ileum, $p=0,037$ rechtes Kolon, $p=0,020$ linkes Kolon). Da Morbus Crohn hauptsächlich das terminale Ileum befällt, liegt auch hier der Verdacht nahe, dass TLR9 an der Entstehung von Morbus Crohn beteiligt ist.

Für den 2848A/G-Polymorphismus wurde keine signifikante Assoziation mit einem der zwei Krankheitsbilder gefunden. Somit scheint dieser Polymorphismus keine Rolle in der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu spielen.

Die hier beschriebenen genetischen Interaktionen zwischen dem -1237T/C-Polymorphismus und den NOD2-Varianten mit einem signifikant erhöhten Morbus Crohn-Risiko bei Trägern beider Varianten sind ein weiterer Beweis für eine Rolle von TLR9 in der Entstehung von Morbus Crohn. Weitere Untersuchungen verschiedener solcher Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden notwendig sein, um diese Krankheitsbilder noch besser verstehen und behandeln zu können.

6. Literaturverzeichnis

Abraham C, Cho JH: Functional consequences of NOD2(CARD5) mutations. *Inflammatory Bowel Disease* **2006**; 12: 641-650

Abreu MT, Arditi M: Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *The Journal of Pediatrics* **2004**; 144: 421-429

Abreu MT, Fukata M, Arditi M: TLR signaling in the gut in health and disease. *The Journal of Immunology* **2005**; 174: 4453-4460

Abreu MT, Taylor KD, Lin Y-C, Hang T, Gaiennie J, Landers CJ, Vasiliauskas EA, Kam LY, Rojany M, Papadakis KA, Rotter JI, Targan SR, Yang H: Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **2002**; 123: 679-688

Achkar J-P, Dassopoulos T, Silverberg MS, Tuvlin JA, Duerr RH, Brant SR, Siminovitch K, Reddy D, Datta LW, Bayless TM, Zhang L, Barmada MM, Rioux JD, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Cohen Z, Yang H, Bromfield GP, Schumm P, Hanauer SB, Cho JH, Nicolae DL and the NIDDK IBD Genetics Consortium: Phenotype-Stratified Genetic Linkage Study demonstrates that IBD2 is an extensive Ulcerative Colitis locus. *Am J Gastroenterol* **2006**; 101: 572-580

Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **2000**; 406: 782-787

Agarwal A, Rhodes JM: Smoking and IBD. *IBD Monitor* **2003**; 4: 114-119

Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, de Silva A, Cook JT, Barnardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP: The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* **2002**; 122: 854-866

Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP: Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2001**; 15: 731-748

Ahmad T, Tambole CP, Jewell D, Colombel J-F: Clinical Relevance of Advances in Genetics and Pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology* **2004**; 126: 1533-1549

Ahmad T, Marshall SE, Jewell D: Genetics of inflammatory bowel disease: The role of the HLA complex. *World J Gastroenterol* **2006**; 12: 3628-3635

Ahmed FE: Role of genes, the environment and their interactions in the etiology of inflammatory bowel diseases. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **2006**; 6: 345-363

Aithal GP, Day CP, Leathart J, Daly AK, Hudson M: Association of single nucleotide polymorphism in the interleukin-4 gene and interleukin-4 receptor gene with Crohn's disease in a British population. *Genes Immun* **2001a**; 2: 44-47

Aithal GP, Craggs A, Day CP, Welfare M, Daly AK, Mansfield JC, Hudson M: Role of Polymorphisms in the Interleukin-10 gene in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **2001b**; 46: 1520-1525

Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **2004**; 4: 499-511

Akira S, Yamamoto M, Takeda K: Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochemical Society Transactions* **2003**; 31: 637- 642

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **2001**; 413: 732-738

Andersson RE, Olaison G, Tysk C, Ekblom A : Appendectomy is followed by increased risk of Crohn's disease. *Gastroenterology* **2003**; 124: 40-46

Annese V, Latiano A, Bovio P, Forabosco P, Piepoli A, Lombardi G, Andreoli A, Astegiano M, Gionchetti P, Riegler G, Sturniolo GC, Clementi M, Rappaport E, Fortina P, Devoto M, Gasparini P, Andriulli A: Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus – a GISC study. *Eur J Hum Genet* **1999**; 7: 567-573

Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, de Silva A, Cullen S, van Heel D, Orchard TR, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP: Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* **2003**; 52: 1133-1139

Askling J, Dickman PW, Karlén P, Broström O, Lapidus A, Löfberg R, Ekblom A: Family history as a risk factor for colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2001a**; 120: 1356-1362

Askling J, Dickman PW, Karlén P, Broström O, Lapidus A, Löfberg R, Ekblom A: Colorectal cancer rates among first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Lancet* **2001b**; 357: 262-266

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF: Blockade of interleukin 6 trans signalling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* **2000**; 6: 583-588

Bagnoli S, Putignano AL, Melean G, Baglioni S, Sestini R, Milla M, d'Albasio G, Genuardi M, Pacini F, Trallori G, Papi L: Susceptibility to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10: 705-708

Bairead E, Harmon DL, Curtis AM, Kelly Y, O'Leary C, Gardner M, Leahy DT, Vaughan D, Keegan D, O'Morain C, O'Donoghue D, Shanahan F, Parfrey NA, Quane KA: Association of NOD2 with Crohn's disease in a homogeneous Irish population. *Eur J Hum Genet* **2003**; 11: 237-244

- Balding J**, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson L, Weir DG, Mahmud N, Smith OP: Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphism. *Mediators Inflamm* **2004**; 13: 181-187
- Balish E**, Warner T: Enterococcus faecalis induces Inflammatory bowel disease in Interleukin-10 Knockout Mice. *American Journal of Pathology* **2002**; 160: 2253-2257
- Barnich N**, Darfeuille-Michaud A: Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **2007**; 13: 5571-5576
- Baron S**, Turck D, Leplat C, Merle V, Gower-Rousseau C, Marti R, Yzet T, Lerebours E, Dupas J-L, Debeugny S, Salomez J-L, Cortot A, Colombel J-F: Environmental risk factors in paediatric inflammatory bowel diseases: a population based case control study. *Gut* **2004**; 357-363
- Basu D**, Lopez I, Kulkarni A, Sellin JH: Impact of Race and Ethnicity on Inflammatory Bowel Disease. *Am J Gastroenterol* **2005**; 100: 2254-2261
- Bauer S**, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB: Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *PNAS* **2001**; 98: 9237-9242
- Bauer S**, Wagner H: Bacterial CpG-DNA licenses TLR9. *Curr Top Microbiol Immunol* **2002**; 270: 145-154
- Baumgart DC**, Carding SR: Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* **2007**; 369: 1627-1640
- Belvin MP**, Anderson KV: A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1996**; 12: 393-416
- Berghöfer B**, Frommer T, König IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, Hackstein H: Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* **2005**; 35: 1147-1154
- Bernstein CN**, Blanchard JF, Kliever E, Wajda A: Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Cancer* **2001**; 91: 854-862
- Bernstein CN**, Blanchard JF, Rawsthorne P, Collins MT: Population-Based Case Control study of seroprevalence of Mycobacterium paratuberculosis in patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Clinical Microbiology* **2004**; 42: 1129-1135
- Binder V**: Epidemiology of IBD during the twentieth century: an integrated view. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2004**; 18: 463-479
- Binder V**: Genetic epidemiology in inflammatory bowel disease. *Dig Dis* **1998**; 16: 351-355
- Binder V**, Orholm M: Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Netherland Journal of Medicine* **1996**; 48: 53-56

Blanchard JF, Bernstein CN, Wajda A, Rawsthorne P: Small-area variations and sociodemographic correlates for the incidence of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Epidemiol* **2001**; 154: 328-335

Bleich A, Mähler M: Environment as a critical factor for the pathogenesis and outcome of gastrointestinal disease: experimental and human inflammatory bowel disease and Helicobacter-induced gastritis. *Pathobiology* **2005**; 72: 293-307

Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tarsigni R, Strober W: Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* **1999**; 116: 557-565

Bonen DK, Cho JH: The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2003a**; 124: 521-536

Bonen DK, Nicolae DL, Moran T, Turkyilmaz MA, Ramos R, Karaliukas R, Brant SR, Duerr RH, Kirschner BS, Hanauer SB, Cho JH: Racial differences in NOD2 variation: characterization of NOD2 in African-Americans with Crohn's disease. *Gastroenterology* **2002**; 122: **A-29 (Abstr)**

Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tsuyoshi T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nunez G: Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* **2003b**; 124: 140-147

Borgaonkar MR, MacIntosh DG, Fardy JM: A Meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95: 725-729

Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS: Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* **1996**; 103: 391-396

Boyko EJ, Theis MK, Vaughan TL, Nicol-Blades B: Increased risk of inflammatory bowel disease associated with oral contraceptive use. *Am J Epidemiol* **1994**; 140: 268-278

Brand S, Staudinger T, Schnitzler F, Pfennig S, Hofbauer K, Dambacher J, Seiderer J, Tillack C, Konrad A, Crospin A, Göke B, Lohse P, Ochsenkühn T: The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile Polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **2005**; 11: 645-652

Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickel MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH: American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology* **1998**; 115: 1056-1061

Brant SR, Picco MF, Achkar JP, Bayless TM, Kane SV, Brzezinski A, Nouvet FJ, Bonen DK, Karban A, Dassopoulos T, Karaliukas R, Beaty TH, Hanauer SB, Duerr RH, Cho JH: Defining complex contributions of NOD2/CARD15 gene mutations, age at onset and tobacco use on Crohn's disease phenotypes. *Inflamm Bowel Dis* **2003a**; 9: 281-289

Brant SR, Panhuysen CIM, Nicolae DL, Reddy DM, Bonen DK, Karaliukas R, Zhang L, Swanson E, Datta LW, Moran T, Ravenhill G, Duerr RH, Achkar JP, Karban AS, Cho JH: MDR1 Ala893 polymorphism is associated with Inflammatory Bowel Disease. *Am J Hum Genet* **2003b**; 73: 1282-1292

Brant SR, Shugart YY: Inflammatory Bowel Disease Gene Hunting by Linkage Analysis. Rationale, Methodology and Present Status of the Field. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10: 300-311

Braun C, Zahn R, Martin K, Albert E, Folwaczny C: Polymorphisms of the ICAM-1 gene are associated with inflammatory bowel disease regardless of the p-ANCA status. *Clin Immunol* **2001**; 101: 357-360

Bridger S, Lee JC, Bjarnason I, Jones JE, Macpherson AJ: In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis. *Gut* **2002**; 51: 21-25

Brignola C, Belloli C, Ardizzone S, Astegiano M, Cottone M, Trallori G: The relationship between heritability and smoking habits in Crohn's disease. *The American Journal of Gastroenterology* **2000**; 95: 3171-3175

Browning BL, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR: Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association. *American Journal of Gastroenterology* **2007**; 102: 2504-2512

Bühning C, Geerds L, Fiedler T, Gentz E, Pitre G, Reuter W, Luck W, Buhner S, Molnar T, Nagy F, Lonovics J, Dignass A, Landt O, Nickel R, Genschel J, Lochs H, Schmidt HHJ, Witt H: DLG5 variants in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **2006**; 101: 786-792

Buhner S, Buning C, Genschel J, Kling K, Herrmann D, Dignass A, Kuechler I, Krueger S, Schmidt HH, Lochs H: Genetic basis for increased intestinal permeability in families with Crohn's disease: role of CARD15 3020insC mutation. *Gut* **2006**; 55: 342-347

Burckhart G, Wolff NA: Structure of renal organic anion and cation transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* **2000**; 278: 853-866

Burich A, Hershberg R, Waggie K, Zeng W, Brabb T, Westrich G, Viney JL, Maggio-Price L: Helicobacter-induced inflammatory bowel disease in IL-10 and T cell-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2001**; 281: G764-G778

Burke DA, Axon AT: Adhesive Escherichia coli in inflammatory bowel disease and infective diarrhoea. *Br Med J* **1988**; 297: 102-107

Calkins BM: A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* **1989**; 34: 1841-1854

Carbonnel F, Macaigne G, Beaugerie L, Gendre JP, Cosnes J: Crohn's disease severity in familial and sporadic cases. *Gut* **1999**; 44: 91-99

Card T, Hubbard R, Logan RFA: Mortality in inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology* **2003**; 125: 1583-1590

Cario E: Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* **2005**; 54: 1182-1193

Cario E, Podolsky DK: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **2000**; 68: 7010-7017

Carr I, Mayberry JF: The effects of migration on ulcerative colitis: a three-year prospective study among Europeans and first- and second-generation South Asians in Leicester (1991-1994). *Am J Gastroenterol* **1999**; 94: 2918-2922

Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, Stanford PM, Sraml ME, Gorska M, Crawford J, Whitmore SA, Shlegel C, Foote S, Kohonen-Corish M, Pavli P: Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* **1998**; 62: 291-298

Cavanaugh J, the IBD International Genetics Consortium: International collaboration provides convincing linkage replication in complex disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet* **2001**; 68: 1165-1171

Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, Bryce ME, O'Callaghan NJ, Rodgers HJ, Magarry GR, Butler WJ, Eaden JA, Roberts-Thomson IC, Pavli P, Wilson SR, Callen DF: CARD15/NOD2 Risk Alleles in the Development of Crohn's Disease in the Australian Population. *Aliment Pharmacol Ther* **2003**; 67: 35-41

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

Chakravarti A: SNPs ... to a future of genetic medicine. *Nature* **2001**; 409: 822-823

Chamailard M, Girardin SE, Viala J, Philpott D: Nods, Nalps and Naip: intracellular regulators of bacterial-induced inflammation. *Cell Microbiol* **2003**; 5: 581-592

Chamberlin W, Graham DY, Hulten K, El-Zimaity HMT, Schwartz MR, Naser S, Shafran I, El-Zaatari FAK: Review article: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis as one cause of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2001**; 15: 337-346

Chamberlin WM, Naser SA: Integrating theories of the etiology of Crohn's disease on the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. *Med Sci Monit* **2006**; 12: RA27-33

Chambers WM, Warren BF, Jewell DP, McC. Mortensen NJ: Cancer surveillance in ulcerative colitis. *British Journal of Surgery* **2005**; 92: 928-936

Chaudhary PM, Ferguson C, Nguyen V, Massa HF, Eby M, Jasmin A, Trask BJ, Hood L, Nelson PS: Cloning and characterization of two Toll/interleukin-1 receptor-like TIL3 and TIL4: evidence for a multi-gene receptor family in humans. *Blood* **1998**; 91: 4020-4027

Chinetti G, Fruchart JC, Staels B: Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* **2000**; 49: 497-505

Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, SaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR: Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95: 7502-7507

Cho JH, Nicolae DL, Ramos R, Fields CT, Rabenau K, Corradino S, Brant SR, Espinosa R, LeBeau M, Hanauer SB, Bodzin J, Bonen DK: Linkage and linkage disequilibrium in chromosome band 1p36 in American Chaldeans with inflammatory bowel disease. *Hum Mol Genet* **2000**; 9: 1425-1432

Cho JH, Weaver CT: The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2007**; 133: 1327-1339

Cho JH: The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews* **2008a**; 8: 458-466

Cho JH: Inflammatory bowel disease: Genetic and epidemiologic considerations. *World Journal of Gastroenterology* **2008b**; 14(3): 338-347

Chuang TH, Ulevitch RJ: Cloning and characterization of a sub-family of human Toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* **2000**; 11: 372-378

Chuang TH, Ulevitch RJ: Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta* **2001**; 1518: 157-161

Clemens MJ, Elia A: The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res* **1997**; 17: 503-524

Colhoun HM, McKeigue PM, Smith GD: Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Nature* **2003**; 361: 865-872

Colombel JF, Grandbastien B, Gower-Rousseau C, Plegat S, Evrard JP, Dupas JL, Gendre JP, Modigliani R, Belaiche J, Hostein J, Hugot JP, van Kruiningen H, Cortot A: Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* **1996**; 111: 604-607

Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Matzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, Lichtiger S, D'Haens G, Diamond RH, Broussard DL, Tang KL, van der Woude CJ, Rutgeerts P: Infliximab, azathioprine, or combination for Crohn's disease. *N Engl J Med* **2010**; 362(15): 1383-1395

Cooke GS, Hill AV: Genetics of susceptibility to Human infectious disease. *Nat Rev Genet* **2001**; 2: 967-977

Corrao G, Tragnone A, Caprilli R, Trallori G, Papi C, Andredi A, Di-Paolo M, Riegler G, Rigo GP, Feran O, Mansi C, Ingrosso M, Valpiani D: Risk of inflammatory bowel disease attributable to smoking, oral contraception and breastfeeding in Italy: a nationwide case con-

trol study. Cooperative investigators of the Italian group for the study of the colon and rectum (GISC). *Int J Epidemiol* **1998**; 27: 397-404

Cosnes J, Carbonnel F, Beaugerie L, Blain A, Reijasse D, Gendre JP: Effects of appendectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut* **2002**; 51: 803-807

Couper R, Kapelushnik J, Griffiths AM: Neutrophil dysfunction in glycogen storage disease Ib: Association with Crohn's-like colitis. *Gastroenterology* **1991**; 100: 549-554

Crawford NPS, Colliver DW, Funke AA, Young MN, Kelley S, Cobbs GA, Petras RE, Galandiuk S: Characterization of Genotype-Phenotype relationships and stratification by the CARD15 variant genotype for Inflammatory Bowel Disease susceptibility loci using multiple short tandem repeat genetic markers. *Human Mutation* **2005**; 25: 156-166

Crichton D, Arnott IDR, Watts D, Mowat C, Hutchinson J, Drummond H, Satsangi J: NOD2/CARD15 mutations in a Scottish Crohn's disease population. *Gastroenterology* **2002**; 122: A298

Croucher PJ, Mascheretti S, Hampe J, Huse K, Frenzel H, Stoll M, Lu T, Nikolaus S, Yang SK, Krawczak M, Kim WH, Schreiber S: Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent populations. *Eur J Hum Genet* **2003**; 11: 6-16

Cummings FJ, Keshav S, Travis SP: Medical management of Crohn's disease. *BMJ* **2008**; 336: 1062-1066

Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J: Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* **1998**; 115: 1066-1071

Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP, Mascheretti S, Sanderson J, Forbes A, Mansfield J, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG: The Contribution of NOD2 Gene Mutations to the Risk and Site of Disease in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2002**; 122: 867-874

Daly MJ, Pearce AV, Farwell L, Fisher SA, Latiano A, Prescott NJ, Forbes A, Mansfield J, Sanderson J, Langelier D, Cohen A, Bitton A, Wild G, Lewis CM, Annese V, Mathew CG, Rioux JD: Association of DLG5 R30Q variant with inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* **2005**; 13: 835-839

Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser A-L, Barnich N, Bringer M-A, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel J-F: High Prevalence of Adherent-Invasive Escherichia coli Associated with Ileal Mucosa in Crohn's Disease. *Gastroenterology* **2004**; 127: 412-421

Dechairo BM, Dimon C, van Heel D, Mackay I, Edwards M, Scambler P, Jewell DP, Cardon LR, Lench NJ, Carey A: Replication and extension studies of inflammatory bowel disease susceptibility regions confirm linkage to chromosome 6p (IBD3). *Eur J Hum Genet* **2001**; 9: 627-633

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **2004**; 303: 1529-1531

Dimon C, Allen M, van Heel DA, et al: Family based association studies of STAT6, a positional candidate gene for IBD. *Gastroenterology* **2001**; **abstr**

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B: Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression and evolution. *Eur Cytokine Netw* **2000**; 11: 362-371

Dubinsky MC, Taylor K, Targan SR, Rotter JI: Immunogenetic phenotypes in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2006**; 12: 3645-3650

Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH: Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* **1995**; 102: 448-455

Duerr RH, Targan SR, Landers CJ, Sutherland LR, Shanahan F: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in ulcerative colitis. Comparison with other colitides/diarrheal illnesses. *Gastroenterology* **1991**; 100: 1590-1596

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Davis S, Preston RA, Chensny LJ, Brown JL, Ehrlich GD, Weeks DE, Aston CE: Linkage and association between inflammatory bowel disease and a locus on chromosome 12. *Am J Hum Genet* **1998**; 63: 95-100

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfulzer R, Weeks DE: High-density genome scan in Crohn disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12. *Am J Hum Genet* **2000**; 66: 1857-1862

Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Achkar JP, Cho JH, Hanauer SB, Brant SR, Bayless TM, Baldassano RN, Weeks DE: Evidence for an inflammatory bowel disease locus on chromosome 3p26: linkage, transmission/disequilibrium and partitioning of linkage. *Hum Mol Genet* **2002**; 11: 2599-2606

Duerr RH: Update on the genetics of IBD. *J Clin Gastroenterol* **2003**; 37: 358-367

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH: A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* **2006**; 314: 1461-1463

Duncan H, Swan C, Green J, Jones P, Brannigan K, Aldersea J, Fryer AA, Strange RC: Susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease: interactions between glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 genotypes. *Clin Chim Acta* **1995**; 240: 53-61

Eaden J, Abrams KR, Mayberry JF: The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* **2001**; 48: 526-535

Eckmann L, Karin M: NOD2 and Crohn's disease: Loss or gain of function? *Immunity* **2005**; 22: 661-667

Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JP: Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *American Journal of Gastroenterology* **2004**; 99: 2393-2404

Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO: Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* **1990a**; 336: 357-359

Ekbom A, Adami HO, Helmick CG, Jonzon A, Zack MM: Perinatal risk factors for inflammatory bowel disease: A case-control study. *Am J Epidemiol* **1990b**; 132: 1111-1119

Ekbom A, Helmick CG, Zack M, Holmberg L, Adami HO: Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* **1992**; 103: 954-960

Ekbom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO: Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease. *Lancet* **1994**; 344: 508-510

El-Tawil AM: Oestrogens and Crohn's disease: the missed link. *Andrologia* **2008**; 40: 141-145

Erridge C, Duncan SH, Bereswill S, Heimesaat MM: The induction of colitis and ileitis in mice is associated with marked increases in intestinal concentrations of stimulants of TLRs 2, 4 and 5. *PloS One* **2010**; 5(2): e9125

Farmer RG, Michener WM, Mortimer EA: Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* **1980**; 9: 271-277

Farrell RJ, LaMont JT: Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **2002**; 31: 41-62

Farrokhyar F, Swarbrick ET, Irvine EJ: A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **2001**; 36: 2-15

Fellows IW, Freeman JG, Holmes GK: Crohn's disease in the city of Derby, 1951-85. *Gut* **1990**; 31: 1262-1265

Ferguson LR, Shelling AN, Browning BL, Huebner C, Petermann I: Genes, diet and inflammatory bowel disease. *Mutation Research* **2007**; 622: 70-83

Fernandez L, Mendoza JL, Martinez A, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, Pena AS, Diaz-Rubio M, de la Concha EG: IBD1 and IBD3 determine location of Crohn's disease in the Spanish population. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10: 715-722

Ferraris A, Torres B, Knafelz D, Barabino A, Lionetti P, de Angelis GL, Iacono G, Papadatou B, D'Amato G, di Ciommo V, Dallapiccola B, Castro M: Relationship between CARD15, SLC22A4/5, and DLG5 polymorphisms and earl-onset inflammatory bowel diseases: an Italian multicentric study. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12: 355-361

Ferreira AC, Almeida Sm, Tavares M, Canedo P, Pereira F, Regalo G, Figueiredo C, Trindade E, Seruca R, Carneiro F, Amil J, Machado JC, Tavela-Veloso F: NOD2/CARD15 and

TNFA, but not IL1B and IL1RN are associated with Crohn' disease. *Inflamm Bowel Dis* **2005**; 11: 331-339

Fidder HH, Olschwang S, Avidan B, Zouali H, Lang A, Bardan E, Bar-Meir S, Colombel JF, Chowers Y: Association between mutations in the CARD15 (NOD2) gene and Crohn's disease in Israeli Jewish patients. *Am J Med Genet* **2003**; 121A: 240-244

Fiocchi C: Inflammatory bowel disease pathogenesis: therapeutic implications. *Chinese Journal of Digestive Disease* **2005**; 6: 6-9

Folwaczny C, Glas J, Török HP: Crohn's disease: an immunodeficiency? *Eur J of Gastroenterol & Hepatol* **2003**; 15: 621-626

Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H: Antinuclear autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease. High prevalence in first-degree relatives. *Dig Dis Sci* **1997**; 42: 1593-1597

Folwaczny C, Noehl N, Endres SP, Loeschke K, Fricke H: Antineutrophil and pancreatic autoantibodies in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **1998**; 33: 523-528

Fonager K, Sorensen HT, Mellekjear L, Olsen JH, Olsen J: Risk of colorectal cancer in relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Cancer Causes and Control* **1998**; 9: 389-392

Forrest K, Symmons D, Foster P: Systematic review: is ingestion of paracetamol or non-steroidal anti-inflammatory drugs associated with exacerbations of inflammatory bowel disease? *Aliment Pharmacol Ther* **2004**; 20: 1035-1043

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, van Gossum A, Deviere J, Rutgeerts P: Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **2004**; 53: 987-992

Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA: The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* **1998**; 10: 363-372

Freeman HJ: Familial Crohn's disease in single or multiple first-degree relatives. *J Clin Gastroenterol* **2002**; 35: 9-13

Friedrichs F, Stoll M: Role of disc large homolog 5. *World J Gastroenterol* **2006a**; 12: 3651-3656

Friedrichs F, Brescianini S, Annese V, Latiano A, Berger K, Kugathasan S, Broeckel U, Nikolaus S, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD, Stoll M: Evidence of transmission ratio distortion of DLG5 R30Q variant in general and implication of an association with Crohn disease in men. *Hum Genet* **2006b**; 119: 305-311

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W: Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel

disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* **1996**; 157: 1261-1270

Gahl WA, Brantly M, Kaiser-Kupfer MI, Iwata F, Hazelwood S, Shotelersuk V, Duffy LF, Kuehl EM, Troendle J, Bernardini I: Genetic defects and clinical characteristics of patients with a form of oculocutaneous albinism (Hermansky-Pudlak syndrome). *N Engl J Med* **1998**; 338: 1258-1264

Garrido A, Martinez MJ, Ortega JA, Lobato A, Rodriguez MJ, Guerrero FJ: Epidemiology of chronic inflammatory bowel disease in the northern area of Huelva. *Rev Esp Enferm Dig* **2004**; 96: 687-694

Garside P, Mcl Mowat A, Khoruts A: Oral tolerance in disease. *Gut* **1999**; 44: 137-142

Gaschè C, Schölmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congress of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* **2000**; 6: 8-15

Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J: New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* **2006**; 367: 1271-84

Gazouli M, Mantzaris G, Archimandritis AJ, Nasioulas G, Anagnou NP: Single nucleotide polymorphisms of OCTN1, OCTN2 and DLG5 genes in Greek patients with Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **2005**; 11: 7525-7530

Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikononopoulos J, Gorgoulis VG: Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14 and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* **2005**; 11: 681-685

Gazouli M, Pachoula I, Panayotou I, Mantzaris G, Chrousos G, Anagnou NP, Roma-Giannikou E: NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **2010**; 16(14): 1753-1758

Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrugger RW, Brummer RJ: Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95: 1008-1013

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* **2001a**; 167: 1882-1885

Gewirtz AT, Simon PO Jr, Schmitt CK, Taylor LJ, Hagedorn CH, O'Brien AD, Neish AS, Madara JL: Salmonella typhimurium translocates flagellin across intestinal epithelia, inducing a proinflammatory response. *J Clin Invest* **2001b**; 107: 99-109

Giallourakis C, Stoll M, Miller K, Hampe J, Lander ES, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD: IBD5 is a General Risk Factor for Inflammatory Bowel Disease: Replication of Association

with Crohn Disease and Identification of a Novel Association with Ulcerative Colitis. *Am J Hum Genet* **2003**; 73: 205-211

Gibson NJ: The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. *Clinica Chimica Acta* **2006**; 363: 32-47

Gilat T, Grossman A, Fireman Z, Rozen P: Inflammatory bowel disease in Jews. New York: Krager **1986**; 135-140

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott D, Sansonetti PJ: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **2003a**; 278: 8869-8872

Girardin SE, Hugot JP, Sansonetti PJ: Lessons from NOD2 studies: towards link between Crohn's disease and bacterial sensing. *Trends in Immunology* **2003b**; 24: 652-658

Girardin SE, Sansonetti PJ, Philpott DJ: Intracellular vs extracellular recognition of pathogens – common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol* **2002**; 10: 193-199

Gleeson MH, Walker JS, Wentzel J, Chapman JA, Harris R: Human leucocyte antigens in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* **1972**; 13: 438-440

Godet PG, May GR, Sutherland LR: Metaanalysis of the role of oral contraceptive agents in inflammatory bowel disease. *Gut* **1995**; 37: 668-673

Gorrochurn P, Hodge SE, Heiman GA, Durner M, Greenberg DA: Non-replication of association studies: “pseudo-failures” to replicate? *Genet Med* **2007**; 9: 325-331

Greenfield C, Aguilar Ramirez JR, Pounder RE, Williams T, Danvers M, Marper SR, Noone P: Clostridium difficile and inflammatory bowel disease. *Gut* **1983**; 24: 713-717

Guarner F, Melagelada JR: Gut flora in health and disease. *Lancet* **2003**; 361: 512-519

Gyde SN, Prior P, Dew MJ, Saunders V, Waterhouse JAH, Allan RN: Mortality in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **1982**; 83: 36-43

Hacker H: Signal transduction pathways activated by CpG-DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* **2000**; 247: 77-92

Halme L, Turunen U, Heliö T, Paavola P, Walle T, Miettinen A, Järvinen H, Kontula K, Färkkilä M: Familial and sporadic inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **2002**; 37: 692-698

Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, Bridger S, Macpherson AJS, Stokkers P, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S: Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut* **2001a**; 48: 191-197

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, Macpherson AJS, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG: Association

between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* **2001b**; 357: 1925-1928

Hampe J, Renzel H, Mirza MM, Croucher PJP, Cuthbert A, Mascheretti S, Huse K, Platzer M, Bridger S, Meyer B, Nürnberg P, Stokkers P, Krawczak M, Mathew CG, Curran M, Schreiber S: Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16p. *PNAS* **2002a**; 99: 321-326

Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJP, Mascheretti S, Jahnsen J, Moum B, Klump B, Krawczak M, Mirza MM, Foelsch UR, Vatn M, Schreiber S: Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* **2002b**; 359: 1661-1665

Hampe J, Heymann K, Krawczak M, Schreiber S: Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. *Int J Colorectal Dis* **2003**; 18: 413-417

Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nürnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME: A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* **1999a**; 64: 808-816

Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, Lynch NJ, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Stokkers P, Morin P, Mirza MM, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S: Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* **1999b**; 65: 1647-1655

Hanauer SB: Inflammatory bowel disease: Epidemiology, Pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12: S3-S9

Hanauer SB: Medical management of Crohn's disease: treatment algorithms 2009. *Dig Dis* **2009**; 27(4): 536-541

Harris G, KuoLee R, Chen W: Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* **2006**; 12: 2149-2160

Harrison's Principles of Internal Medicine von A. Fauci von Mcgraw-Hill Professional **2008**

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV: The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **1988**; 52: 269-279

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

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, : The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **2001**; 410: 1099-1103

Hayward PA, Satsangi J, Jewell DP: Inflammatory bowel disease and the X chromosome. *Q J Med* **1996**; 89: 713-718

van Heel DA, Carey AH, Jewell DP: Identification of novel polymorphisms in the beta7 integrin gene: family-based association studies in inflammatory bowel disease. *Genes Immun* **2001**; 2: 455-460

van Heel DA, Udalova IA, de Silva AP, McGovern DP, Kinouchi Y, Hull J, Lench NJ, Cardon LR, Carey AH, Jewell DP, Kwiatkowski D: Inflammatory bowel diseases associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. *Hum Mol Genet* **2002**; 11: 1281-1289

van Heel DA, Dechairo BM, McGovern DPB, Negoro K, Carey AH, Cardon LR, Mackay I, Jewell DP, Lench NJ: The IBD6 Crohn's disease locus demonstrates complex interactions with CARD15 and IBD5 disease-associated variants. *Human Molecular Genetics* **2003**; 12: 2569-2575

van Heel DA, Fisher SA, Kirby A, Daly MJ, Rioux JD, Lewis CM: Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human Molecular Genetics* **2004**; 13: 763-770

van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt KA, Lundberg AM, Ahmad T, McGovern DP, Onnie C, Negoro K, Goldthorpe S, Foxwell BM, Mathew CG, Forbes A, Jewell DP, Playford RJ: Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* **2005a**; 365: 1794-1796

van Heel DA, Ghosh S, Hunt K, Mathew C, Forbes A, Jewell D, Playford R: Synergy between TLR9 and NOD2 innate immune responses is lost in genetic Crohn's disease. *Gut* **2005b**; 54: 1553-1557

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **2004**; 303: 1526-1529

Heliö T, Halme L, Lappalainen M, Fodstad H, Paavola-Sakki P, Turunen U, Färkkilä M, Krusius T, Kontula K: CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* **2003**; 52: 558-562

Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S: Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **2002**; 3: 196-200

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **2000**; 408: 740-745

Hermon-Taylor J: Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the causation of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* **2000**; 6: 630-632

Herrlinger K, Fellermann K, Stange EF: Standardtherapie der Colitis ulcerosa. *Internist* **2002**; 43: 1367-1375

Heuschen UA, Hinz U, Allemeyer EH, Stern J, Lucas M, Autschbach F, Herfarth C, Heuschen G: Backwash ileitis is strongly associated with colorectal carcinoma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **2001**; 120: 841-847

Hilsden RJ, Meddings JB, Sutherland LR: Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **1996**; 110: 1395-1403

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA: Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **1999**; 284: 1313-1318

Hoffmann JC, Zeitz M: Standardtherapie von Morbus Crohn. *Internist* **2002**; 43: 1376-1385

Holtmann M, Mudter J, Galle PR, Neurath MF: Das mukosale Immunsystem. Wie klar ist die Pathophysiologie? *Internist* **2002**; 43: 1343-1353

Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissanswen GW: TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2007**; 22: 1760-1766

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G: Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology* **2002**; 168: 4531-4537

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **1999**; 162: 3749-3752

Hubbard J, Surawicz CM: Etiological role of Mycobacterium in Crohn's disease: an assessment of the literature. *Dig Dis Sci* **1999**; 1: 6-13

Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennar, Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G: Mapping of susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* **1996**; 379: 821-823

Hugot JP, Zouali H, Lesage S, Thomas G: Etiology of the inflammatory bowel diseases. *Int J Colorect Dis* **1999**; 14: 2-9

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

Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cezard J-P: Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* **2003a**; 362: 2012-2015

Hugot JP, Zouali H, Lesage S: Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2003b**; 15: 593-597

Hugot JP: Inflammatory bowel disease: a complex group of genetic disorders. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2004**; 18: 451-462

Hur JW, Shin HD, Park BL, Kim LH, Kim SY, Bae SC: Association study of Toll-like receptor 9 gene polymorphism in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **2005**; 65: 266-270

Hussain SP, Amstad P, Raja K, Ambs S, Nagashima M, Bennett WP, Shields PG, Ham AJ, Swenberg JA, Marrogi AJ, Harris CC: Increased p53 mutation load in noncancerous colon tissue from ulcerative colitis: A cancer-prone chronic inflammatory disease. *Cancer Res* **2000**; 60: 3333-3337

Ina K, Itoh J, Fukushima K, Kusugami K, Yamaguchi T, Kyokane K, Imada A, Binion DG, Musso A, West GA, Dobra GM, McCormick TS, Lapetina EG, Levine AD, Ottaway CA, Fiocchi C: Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* **1999**; 163: 1081-1090

Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nunez G: NOD-LRR Proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* **2005**; 74: 355-383

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Guttierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* ; 278: 5509-5512

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

Inoue S, Matsumoto T, Iida M, Mizuno M, Kuroki F, Hoshika K, Shimizu M: Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. *Am J Gastroenterol* **1999**; 94: 2441-2446

Ioannidis JPA: Non-Replication and Inconsistency in the genome-wide association setting. *Hum Hered* **2007**; 64: 203-213

Isaacs KL, Lewis JD, Sandborn WJ, Sands BE, Targan SR: State of the Art: IBD Therapy and Clinical Trials in IBD. *Inflamm Bowel Dis* **2005**; 11: S3-S12

Itzkowitz SH, Present DH: Consensus Conference: Colorectal Cancer Screening and Surveillance in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* **2005**; 11: 314-321

Janeway CA Jr: The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **1992**; 13: 11-16

Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **2002**; 20: 197-216

Jess T, Loftus Jr EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Tremaine WJ, Melton LJ, Munkholm P, Sandborn WJ: Survival and cause-specific mortality in patients with inflammatory bowel dis-

ease: a long-term outcome study in Olmsted County, Minnesota, 1940-2004. *Gut* **2006**; 55: 1248-1254

Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, de Simone C, Madsen K: DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* **2004**; 126: 1358-1373

Jones P, Fine P, Piracha S: Crohn's disease and measles. *Lancet* **1997**; 349: 473

de Jong DJ, Franke B, Naber AH, Willemsen JJ, Heister AJ, Brunner HG, de Kovel CG, Hol FA: No evidence for involvement of IL-4R and CD11B from the IBD1 region and STAT6 in the IBD2 region in Crohn's disease. *Eur J Hum Genet* **2003**; 11: 884-887

Joossens S, Vermeire S, Van Steen K, Godefroidis G, Claessens G, Pierik M, Vlietinck R, Aerts Rk, Rutgeerts P, Bossuyt X: Pancreatic Autoantibodies in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10: 771-777

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ: Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **2001**; 194: 863-869

Kagnoff MF, Eckmann L: Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* **1997**; 100: 6-10

Kaisho T, Akira S: Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* **2006**; 117: 979-987

Kambe N, Nishikomori R, Kanazawa N: The cytosolic pattern-recognition receptor NOD2 and inflammatory granulomatous disorders. *Journal of Dermatological Science* **2005**; 39: 71-80

Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CIM, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR: Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Mol Genet* **2004**; 13: 35-45

Karlinger K, Györke T, Makö E: The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology* **2000**; 35: 154-167

Katschinski B, Fingerle D, Scherbaum B, Goebell H: Oral contraceptive use and cigarette smoking in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **1993**; 38: 1596-1600

Kelsall B: Getting to the guts of NOD2. *Nature Medicine* **2005**; 11: 383-384

Kimbrell DA, Beutler B: The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* **2001**; 2: 256-267

Kikuchi K, Lian ZX, Kimura Y, Selmi C, Yang GX, Gordon SC, Invernizzi P, Podda M, Coppel RL, Ansari AA, Ikehara S, Miyakawa H, Gershwin ME: Genetic polymorphisms of toll-like receptor 9 influence the immune response to CpG and contribute to hyper-IgM in primary biliary cirrhosis. *Journal of Autoimmunity* **2005**; 24: 347-352

- Kirsner JB:** Historical origins of current IBD concepts. *World J Gastroenterol* **2001**; 7: 175-184
- Klein W,** Tromm A, Griga T, Fricke H, Fowaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Epplen JT: A polymorphism in IL11 gene is associated with ulcerative colitis. *Genes Immun* **2002a**; 3: 494-496
- Klein W,** Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, Eitner K, Marx M, Duerig N, Epplen JT: A polymorphism in the CD-14 gene is associated with Crohn disease. *Scand J Gastroenterol* **2002b**; 37: 189-191
- Klein W,** Tromm A, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, Epplen J, Schmiegel W, Griga T: The G2964A polymorphism of the STAT6 gene in inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease* **2005**; 37: 159-161
- Klement E,** Cohen RV, Boxman J, Joseph A, Reif S: Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *J Clin Nutr* **2004**; 80: 1342-1352
- Koletzko S,** Griffiths A, Corey M, Smith C, Sherman P: Infant feeding practices and ulcerative colitis in childhood. *Br Med J* **1991**; 302: 1580-1581
- Koletzko S,** Sherman P, Correy M, Griffiths A, Smith C: Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *Br Med J* **1989**; 298: 1617-1618
- Korzenik JR:** Past and Current Theories of Etiology of IBD. Toothpaste, Worms and Refrigerators. *J Clin Gastroenterol* **2005**; 39: S59-S65
- Korzenik JR,** Dieckgraefe BK: Is Crohn's disease an immunodeficiency? A Hypothesis suggesting possible early events in the pathogenesis of Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* **2000**; 45: 1121-1129
- Koutroubakis IE,** Vlachonikolis IG: Appendectomy and the development of ulcerative colitis: Results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol* **2000**; 95: 171-176
- Koutroubakis IE,** Vlachonikolis IG, Kouroumalis EA: Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis* **2002**; 8: 277-286
- Kraus TA,** Cheifetz A, Toy L, Meddings JB, Mayer L: Evidence for a Genetic Defect in Oral Tolerance Induction in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12: 82-88
- Krieg AM:** The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **2000**; 12: 35-43
- Krieg AM:** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **2002**; 20: 709-760
- Krieg AM,** Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **1995**; 374: 546-549

Krishnan A, Korzenik JR: Inflammatory bowel disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin North Am.* **2002**; 31: 21-39

Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung B, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G: Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **2001**; 31: 3026-3037

Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S: Pathogen recognition by innate receptors. *Journal of Infection and Chemotherapy* **2008**; 14: 86-92

Kurata JH, Kantor-Fish S, Frankl H, Godby P, Vadheim CM: Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. *Gastroenterology* **1992**; 102: 1940-1948

Lakatos PL, Fischer S, Claes K, Kovacs A, Molnar T, Altorjay I, Demeter P, Tulassay Z, Palatka K, Papp M, Rutgeerts P, Szalay F, Papp J, Vermeire S, Lakatos L: DLG5 R30Q is not associated with IBD in Hungarian IBD patients but predicts clinical response to steroids in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12: 362-368

Lakatos PL, Fischer S, Lakatos L, Gal I, Papp J: Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: Pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll"? *World J Gastroenterol* **2006**; 12: 1829-1841

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

Lammers KM, Ouburg S, Crusius SA, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Caramelli E, Conte R, Poggioli G, Campieri M, Pena AS: Combined carriage of TLR9 -1237 and CD14 -260T alleles enhances the risk of developing chronic relapsing pouchitis. *World J Gastroenterol* **2005**; 11: 7323-7329

Lander E, Kruglyak L: Genetic dissection of complex trait: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **1995**; 11: 241-247

Langholz E, Munkholm P, Krasilnikoff A, Binder V: Inflammatory bowel disease with onset in childhood. Clinical features, morbidity and mortality in a regional cohort. *Scand J Gastroenterol* **1997**; 32: 139-147

Lashner BA, Kane SV, Hanauer SB: Lack of association between oral contraceptive use and Crohn's disease, a community based matched case-control study. *Gastroenterology* **1989**; 97: 1442-1447

Lashner BA, Kane SV, Hanauer SB: Lack of association between oral contraceptive use and ulcerative colitis. *Gastroenterology* **1990**; 99: 1032-1036

Lasker MV, Nair SK: Intracellular TLR signaling: a structural perspective on human disease. *The Journal of Immunology* **2006**; 177: 11-16

Latiano A, Palmieri O, Valvano RM, D'Incà R, Vecchi M, Ferraris A, Sturniolo GC, Spina L, Lombardi G, Dallapiccola B, Andriulli A, Devoto M, Annese V: Contribution of IBD5 Locus to Clinical Features of IBD Patients. *Am J Gastroenterol* **2006**; 101: 318-325

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nature Immunology* **2004**; 5: 190-198

Lawrence IC, Fiocchi C, Chakravarti S: Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet* **2001**; 10: 445-456

Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, Silverman EK, Martinez F, Weiss ST: Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* **2003**; 81: 85-91

Lee FI, Bellary SV, Francis C: Increased occurrence of psoriasis in patients with Crohn's disease and their relatives. *Am J Gastroenterol* **1990**; 85: 962-963

Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E: Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature Cell Biology* **2006**; 8: 1327-1236

Lee JC, Lennard-Jones JE, Cambrige G: Antineutrophil antibodies in familial inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **1995**; 108: 428-433

Lees CW, Satsangi J: Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2009**; 3(5): 513-534

Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee CW, Kruhlak MJ, Segal DM: TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *The Journal of Immunology* **2004**; 173: 1179-1183

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA: The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in drosophila adults. *Cell* **1996**; 86: 973-983

Leong RWL, Armuzzi A, Ahmad T, Wong ML, Tse P, Jewell DP, Sung JY: NOD2/CARD15 gne polymorphisms and Crohn's disease in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* **2003**; 17: 1465-1470

Lesage S, Zouali H, Colombel JF, Belaiche J, Cezard JP, Tysk C, Almer S, Gassull M, Binder V, Chamaillard M, le Gall I, Thomas G, Hugot JP: Genetic analyses of chromosome 12 loci in Crohn's disease. *Gut* **2000**; 47: 787-791

Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP: CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-

phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* **2002**; 70: 845-857

Levine A, Karban A, Eliakim R, Shaoul R, Reif S, Pacht A, Wardi J, Yakir B, Silver EL: A polymorphism in the TNF-alpha promoter gene is associated with pediatric onset and colonic location of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **2005**; 100: 407-413

Lichtenberger GS, Rlavell RA, Alexopoulou L: Innate immunity and apoptosis in IBD. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10: S58-S62

Lien E, Ingalls RR: Toll-like receptors. *Crit Care Med* **2002**; 30: S1-S11

Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, Carroll JD, Espevik T, Ingalls RR, Radolf JD, Golenbock DT: Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* **1999**; 274: 33419-33425

van Limbergen J, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J: The Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Gastroenterology* **2007**; 102: 2820-2831

van Limbergen J, Wilson DC, Satsangi J: The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2009**; 10: 89-116

Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jarnerot G: Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study. *Gut* **1988**; 29: 352-357

Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ, Kuipers EJ, Wilson HJ, de Rooij FW: Card15 and Crohn's disease: healthy homozygous carriers of the 3020insC frameshift mutation. *Am J Gastroenterol* **2003**; 98: 613-617

Lipford GB, Heeg K, Wagner H: Bacterial DNA as immune cell activator. *Trends Microbiol* **1998**; 6: 496-500

Liu Y, van Kruiningen HJ, West AB, Cartun RW, Cortot A, Colombel JF: Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* **1995**; 108: 1396-1404

Lodes MJ, Cong Y, Elson CO, Mohamath R, Landes CJ, Targan SR, Fort M, Hershberg RM: Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease. *J Clin Invest* **2004**; 113: 1296-1306

Loftus Jr EV: Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterology* **2004**; 126: 1504-1517

Lohmuller JL, Pemberton JH, Dozois RR, Ilstrup D, van Heerden J: Pouchitis and extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease after ileal pouch-anal anastomosis. *Ann Surg* **1990**; 211: 622-627

Louis E, Collard A, Oger AF, Degroote E, Aboul Nasr El Yafi FA, Belaiche J: Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* **2001**; 49: 777-782

- Low JH**, Williams FA, Yang X, Cullen S, Colley J, Ling KL, Armuzzi A, Ahmad T, Neville MJ, Dechairo BM, Walton R, Lench NJ, Jewell DP: Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* **2004**; 10: 173-181
- Ma Y**, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang H: A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **1999**; 5: 271-278
- Madsen K**, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, de Simone C: Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* **2001**; 121: 580-591
- Madsen KL**, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN: Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* **1999a**; 116: 1107-1114
- Madsen KL**, Malfair D, Gray D, Doyle JS, Jewell LD, Fedorak RN: Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* **1999b**; 5: 262-270
- Mahadeo R**, Markowitz J, Fisher S, Daum F: Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis in children. *J Pediatr* **1991**; 118: 904-906
- Mahmud N**, Molloy A, McPartlin J, Corbally R, Whitehead AS, Scott JM, Weir DG: Increased prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase C677T variant in patients with inflammatory bowel disease and its clinical implications. *Gut* **1999**; 45: 389-394
- Mallas EG**, Mackintosh P, Asquith P, Cooke WT: Histocompatibility antigens in inflammatory bowel disease. Their clinical significance and their association with arthropathy with special reference to HLA-B27 (w27). *Gut* **1976**; 17: 906-910
- Martini GA**, Brandes JW: Increased consumption of refined carbohydrates in patients with Crohn's disease. *Klin Wochenschr* **1976**; 54: 367-371
- Mathew CG**, Lewis CM: Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Human Molecular Genetics* **2004**; 13: R161-R18
- Mathy NL**, Scheuer W, Lanzendorfer M, Honold K, Ambrosius D, Norley S, Kurth R: Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Immunology* **2000**; 100: 63-69
- McCarthy J**, O'Mahony L, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan EE, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan GC, Kiely B, Collins JK, Shanahan F: Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. *Gut* **2003**; 52: 975-980
- McGovern DPB**, van Heel DA, Negoro K, Ahmad T, Jewell DP: Further evidence of IBD5/CARD15 (NOD2) epistasis in the susceptibility to ulcerative colitis. *Am J Hum Genet* **2003**; 73: 1465-1466
- McGovern DPB**, Hysi P, Ahmad T, van Heel DA, Moffatt MF, Carey A, Cookson WOC, Jewell DP: Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1

(CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. *HumanMolecular Genetics* **2005**; 14: 1245-1250

McKenzie H, Main J, Penningotn CR, Parratt D: Antibody to selected strains of *Saccharomyces cerevisiae* (baker's and brewer's yeast) and *Candida albicans* in Crohn's disease. *Gut* **1990**; 31: 536-538

Medici V, Mascheretti S, Croucher PJ, Stoll M, Hmape J, Grebe J, Sturniolo GC, Solberg C, Jahnsen J, Moum B, Schreiber S, Vatn MH: Extreme heterogeneity in CARD15 and DLG5 Crohn disease-associated polymorphisms between German and Norwegian populations. *Eur J Hum Genet* **2006**; 14: 459-468

Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews* **2001**; 1: 135-145

Medzhitov R, Janeway CA Jr: Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **1997a**; 9: 4-9

Medzhitov R, Janeway C Jr: Innate immunity. *The New England Journal of Medicine* **2000a**; 343: 338-344

Medzhitov R, Janeway C Jr: Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunology Reviews* **2000b**; 173: 89-97

Medzhitov R, Janeway C Jr: The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends in Microbiology* **2000c**; 8: 452-456

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr: A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **1997b**; 388: 394-397

de Mesquita MB, Civitelli F, Levine A: Epidemiology, genes and inflammatory bowel diseases in childhood. *Digestive and Liver Disease* **2008**; 40: 3-11

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* **1988**; 16: 1215

Mirza MM, Fisher SA, King K, Cuthbert AP, Hampe J, Sanderson J, Mansfield J, Donaldson P, Macpherson AJ, Forbes A, Schreiber S, Lewis CM, Mathew CG: Genetic evidence for interaction of the 5q31 cytokine locus and the CARD15 gene in Crohn disease. *Am J Hum Genet* **2003**; 72: 1018-1022

Miyake K: Roles for accessory molecules in microbial recognition by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* **2006**; 12: 195-204

Monsen U, Bernell O, Johansson C, Hellers G: Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **1991**; 26: 302-306

Monsen U, Broström O, Nordenvall B, Sörstad J, Hellers G: Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* **1987**; 22: 214-218

- Montgomery SM**, Lambe M, Wakefield AJ, Pounder RE, Ekbom A: Siblings and the risk of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **2002**; 37: 1301-1308
- Murillo L**, Crusius B, van Bodegraven AA, Alizadeh BZ, Pena AS: CARD15 gene and the classification of Crohn's disease. *Immunogenetics* **2002**; 54: 59-61
- Murillo LS**, Morr  SA, Pena AS: Toll-like receptors and NOD/CARD proteins: pattern recognition receptors are key elements in the regulation of immune response. *Drugs of Today* **2003**; 39: 415-438
- Murray PJ**: NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Current Opinion in Immunology* **2005**; 17: 352-358
- Naganuma M**, Iizuka B, Torii A, Ogihara T, Kawamura Y, Ichinose M, Kojima Y, Hibi T, Tokyo Gut C: Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis and reduces its recurrence: results of a multicenter case-controlled study in Japan. *Am J Gastroenterol* **2001**; 96: 1123-1126
- Nayar M**, Rhodes JM: Management of inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J* **2004**; 80: 206-213
- Negoro K**, McGovern KP, Kinouchi Y, Takahashi S, Lench NJ, Shimosegawa T, Carey A, Cardon LR, Jewell DP, van Heel DA: Analysis of the IBD5 locus and potential gene-gene interactions in Crohn's disease. *Gut* **2003**; 52: 541-546
- Neurath MF**, Finotto S, Glimcher LH: The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature Med* **2002**; 8: 567-573
- Newman B**, Silverberg MS, Gu X, Zhang Q, Lazaro A, Steinhart H, Greenberg GR, Griffiths AM, McLeod RS, Cohen Z, Fernández-Vina M, Amos CI, Siminovitch K: CARD15 and HLA DRB1 alleles influence susceptibility and disease localization in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **2004**; 99: 306-315
- Newman WG**, Gu X, Wintle RF, Liu X, van Oene M, Amos CI, Siminovitch KA: DLG5 variants contribute to Crohn disease risk in a Canadian population. *Hum Mutat* **2006**; 27: 353-358
- Ng MW**, Lau CS, Chan TM, Wong WHS, Lau YL: Polymorphisms of toll-like receptor9 (TLR9) gene with systemic lupus erythematosus in Chinese. *Rheumatology* **2005**; 44: 1456-1468
- Noble CL**, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Amott ID, Satsangi J: The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology* **2005a**; 129: 1854-1864
- Noble CL**, Nimmo ER, Drummond H, Smith L, Arnott ID, Satsangi J: DLG5 variants do not influence susceptibility to inflammatory bowel disease in the Scottish population. *Gut* **2005b**; 54: 1416-1420
- Noomen CG**, Hommes DW, Fidder HH: Update on genetics in inflammatory disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2009**; 23(2): 233-243

Novak N, Yu CF, Bussmann C, Maintz L, Peng WM, Hart J, Hagemann T, Diaz-Lacava A, Baurecht HJ, Klopp N, Wagenpfeil S, Behrendt H, Bieber T, Ring J, Illig T, Weidinger S: Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy* **2007**; 62: 766-772

Obermeier F, Dunger N, Deml L, Herfarth H, Scholmerich J, Falk W: CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice. *Eur J Immunol* **2002**; 32: 2084-2092

Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Grunwald N, Herfarth H, Scholmerich J, Falk W: Contrasting activity of cytosin-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis. *Clin Exp Immunol* **2003**; 134: 217-224

Obermeier F, Dunger N, Strauch UG, Hofmann C, Bleich A, Grunwald N, Hedrich HJ, Aschenbrenner E, Schlegelberger B, Rogler G, Scholmerich J, Falk W: CpG motifs of bacterial DNA essentially contribute to the perpetuation of chronic intestinal inflammation. *Gastroenterology* **2005**; 129: 913-927

O'Callaghan NJ, Adams KE, van Heel DA, Cavanaugh JA: Association of TNF-alpha-857C with inflammatory bowel disease in the Australian population. *Scand J Gastroenterol* **2003**; 38: 533-534

Oda K, Kitano H: A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. *Molecular Systems Biology* **2006**; 2: 2006.0015

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **2001**; 411:603-606

Ohkusa T, Nomura T, Sato N: The Role of Bacterial Infection in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Internal Medicine* **2004**; 43: 534-539

Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N: Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* **1996**; 5: 1679-1683

Okayama N, Fufimura K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Fujiwara M, Matsubara T, Maekawa T, Hazama S, Oka M, Nohara H, Kayano K, Okita K, Hinoda Y: Simple genotype analysis of the Asp299Gly polymorphism of the Toll-like receptor-4 gene that is associated with lipopolysaccharide hyporesponsiveness. *J Clin Lab Anal* **2002**; 16: 56-58

Olsson R, Danielsson A, Jarnerot G, Lindstrom E, Loof L, Rolny P, Ryden BO, Tysk C, Wallerstedt S: Prevalence of primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **1991**; 100: 1319-1323

O'Neill LAJ: How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know. *Current Opinion in Immunology* **2006**; 18: 3-9

Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO: Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* **2000**; 35: 1075-1081

Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V: Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **1991**; 324: 84-88

Oudkerk Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, Goldschmeding R, von Blomberg BM, Pena AS, Dolman KM, Bril H, Dekker W, Nauta JJ: Serum antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease are mainly associated with ulcerative colitis. A correlation study between perinuclear antineutrophil cytoplasmic autoantibodies and clinical parameters, medical and surgical treatment. *Gut* **1993**; 34: 46-50

Owens DW, Wilson NJ, Hill AJM, Rugg EL, Porter RM, Hutcheson AM, Quinlan RA, van Heel D, Parkes M, Jewell DP, Camppbell SS, Ghosh S, Satsangi J, Lane EB: Human keratin 8 mutations that disturb filament assembly observed in inflammatory bowel disease patients. *J Cell Sci* **2004**; 117: 1989-1999

Paavola P, Helio T, Kiuru M, Halme L, Turunen U, Terwiliger J, Karvonen AL, Julkunen R, Niemela S, Nurmi H, Farkkila M, Kontula K: Genetic analysis in Finnish families with inflammatory bowel disease supports linkage to chromosome 3p21. *Eur J Hum Genet* **2001**; 9: 328-334

Paavola-Sakki P, Ollikainen V, Heliö T, Halme L, Turunen U, Lahermo P, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K: Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. *Eur J Hum Genet* **2003**; 11: 112-120

Packey CD, Sartor RB: Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Journal of Internal Medicine* **2008**; 263: 597-606

Pardi DS, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Poland GA, Melton LJ III.: Perinatal exposure to measles virus is not associated with the development of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **1999**; 5: 104-106

Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH: The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between Ulcerative Colitis and Crohn Disease. *Am J Hum Genet* **2000**; 67: 1605-1610

Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J: Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clinical and Experimental Immunology* **2005**; 141: 298-306

Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, Rutgeerts P: Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology* **1996**; 111: 597-603

Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang O, Gu X, Newman B, van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA: Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* **2004**; 36: 471-475

- Pender SL**, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, McDonald TT: A major role of matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol* **1997**; 158: 1582-1590
- Persson PG**, Ahlbom A, Hellers G: Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study. *Epidemiology* **1992**; 3: 47-52
- Petronis A**, Petroniene R: Epigenetics of inflammatory bowel disease. *Gut* **2000**; 47: 302-306
- Pierik M**, Yang H, Barmada MM, Cavanaugh JA, Annese V, Brant SR, Cho JH, Duerr RH, Hugot J-P, McGovern DP, Paavola-Sakki P, Radford-Smith GL, Pavli P, Silverberg MS, Schreiber S, Taylor KD, Vlietinck R: The IBD international genetics consortium provides further evidence for linkage to IBD4 and shows gene-environment interaction. *Inflamm Bowel Dis* **2005**; 11: 1-7
- Philpott DJ**, Viala J: Towards an understanding of the role of NOD2/CARD15 in the pathogenesis of Crohn's disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2004**; 18: 555-568
- Plevy SE**, Targan SR, Yang H, Fernandez D, Rotter JJ, Toyoda H: Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease – associated haplotype on chromosome 6. *Gastroenterology* **1996**; 110: 1053-1060
- Plevy SE**, Landers CJ, Prehn J, Carramanzana NM, Deem RL, Shealy D, Targan SR: A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* **1997**; 159: 6276-6282
- Podolsky DK**: Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* **2002**; 347: 417-429
- Polito JM**, Childs B, Mellits ED, Tokayer AZ, Harris ML, Bayless TM: Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* **1996**; 111: 580-56
- Potocnik U**, Ferkolj I, Glavac D, Dean M: Polymorphism in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis. *Genes Immun* **2004**; 5: 530-539
- Powrie F**: T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. *Immunity* **1995**; 3: 171-174
- Price WH**: A high incidence of chronic inflammatory bowel disease in patients with Turner's syndrome. *J Med Genet* **1979**; 16: 263-266
- Probert CS**, Jayanthi V, Pinder D, Wicks AC, Mayberry JF: Epidemiological study of ulcerative proctocolitis in Indian migrants and the indigenous population of Leicestershire. *Gut* **1992**; 33: 687-69
- Probert CS**, Jayanthi V, Hughes AO, Thompson JR, Wicks AC, Mayberry JF: Prevalence and family risk of ulcerative colitis and Crohn's disease: an epidemiological study among Europeans and south Asians in Leicestershire. *Gut* **1993**; 34: 1547-1551

Pullan RD, Rhodes J, Ganesh S, Mani V, Morris JS, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C, Thomas GA: Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. *N Engl J Med* **1994**; 330: 811-815

Purmann J, Zeidler H, Bertrams J, Juli E, Cleveland S, Berges W, Gemsa R, Specker C, Reis HE: HLA antigens in ankylosing spondylitis associated with Crohn's disease. Increased frequency of the HLA phenotype B27, B44. *J Rheumatol* **1988**; 15: 1658-1661

Quinton JF, Sendid B, Reumaux D, Duthilleul P, Cortot A, Grandbastien B, Charrier G, Targan SR, Colombel JF, Poulain D: Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies combined with antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in inflammatory bowel disease: prevalence and diagnostic role. *Gut* **1998**; 42: 788-79

Rachima C, Maoz E, Apter S, Thaler M, Grossman E, Rosenthal T: Cytomegalovirus infection associated with ulcerative colitis in immunocompetent individuals. *Postgrad Med J* **1998**; 74: 486-489

Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, Hayashi T, Leider-Trejo L, Lee J, Leoni LM, Raz E: Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* **2002**; 122: 1428-1441

Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E: Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* **2004**; 126: 520-528

Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B, Florin TH: Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **2002**; 51: 808-81

Radlmayr M, Török HP, Martin K, Folwaczny C: The c-Insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. *Gastroenterology* **2002**; 122: 2091-2092

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R: Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* **2004**; 118: 229-241

Rasmussen HH, Fallingborg J, Mortensen PB, Freund L, Tage-Jensen U, Kruse V, Rasmussen SN: Primary sclerosing cholangitis in patients with ulcerative colitis. *Scan J Gastroenterol* **1992**; 27: 732-736

Rath HC: The role of endogenous bacterial flora: bystander or the necessary prerequisite? *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2003**; 15: 615-620

Rath HC, Schultz M, Freitag R, Dieleman LA, Li F, Linde HJ, Scholmerich J, Sartor RB: Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* **2001**; 69: 2277-2285

Reif S, Klein I, Lubin F, Farbstein M, Hallak A, Gillat T: Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* **1997**; 40: 754-760

Reinhard C, Rioux JD: Role of the IBD5 susceptibility locus in the inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12: 227-238

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P: Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* **2001**; 2: 361-367

Rhodes JM, Campbell BJ: Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends in Molecular Medicine* **2002**; 8: 10-16

Riordan AM, Ruxton CH, Hunter JO: A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr* **1998**; 52: 229-338

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton A, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA: Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* **2000**; 66: 1863-1870

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, Cohen Z, Delmonte T, Kocher K, Miller K, Guschwan S, Kulbokas EJ, O'Leary S, Winchester E, Dewar K, Green T, Stone V, Chow C, Cohen A, Langelier D, Lapointe G, Gaudet D, Faith J, Branco N, Bull SB, McLeod RS, Griffiths AM, Bitton A, Greenberg GR, Lander ES, Siminovitch KA, Hudson TJ: Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* **2001**; 29: 223-22

von Ritter C, Sekizuka E, Grisham MB, Granger DN: The chemotactic peptide N-formyl methionyl-leucyl-phenylalanine increases mucosal permeability in the distal ileum of the rat. *Gastroenterology* **1988**; 95: 651-656

Robertson DJ, Sandler RS : Measles virus and Crohn's disease: a critical appraisal of the current literature. *Inflamm Bowel Dis* **2001**; 7: 51-57

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95: 588-593

Rodriguez LAG, Gonzales-Perez A, Johansson S, Wallander MA: Risk factors for inflammatory bowel disease in the general population. *Aliment Pharmacol Ther* **2005**; 22: 309-315

Rodriguez-Bores L, Fonseca GC, Villeda MA, Yamamoto-Furusho JK: Novel genetic markers in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **2007**; 13: 5560-5570

Roe TF, Coate TD, Thomas DW, Miller JH, Gilsanz V: Brief report: Treatment of chronic inflammatory bowel disease in glycogen storage disease type Ib with colony-stimulating factors. *N Engl J Med* **1992**; 326: 1666-1669

Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI: Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* **1989**; 96: 1016-102

Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G: Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Human Immunology* **2002**; 63: 1111-1119

Rotter JI, Yang H, Shohat T: Genetic complexities of inflammatory bowel disease and its distribution among the Jewish people. *New York: Oxford Univ Press* **1992**; 395-411

Rubin DT, Hanauer SB: Smoking and inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2000**; 12: 855-86

Rumio C, Besusso D, Palazzo M, Selleri S, Sfondrini L, Dubini F, Menard S, Balsari A: Degranulation of paneth cells via Toll-like receptor 9. *American journal of pathology* **2004**; 165: 373-381

Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrugger RW: 'Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: A case-control study with special emphasis on nutritional factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1998**; 10: 342-249

Russel MG, Pastoor CJ, Janssen KM, van Deursen CT, Muris JW, van Wijlick EH, Stockbrugger RW: Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand J Gastroenterol Suppl* **1997**; 223: 88-91

Russel RK, Nimmo ER, Satsangi J: Molecular genetics of Crohn's disease. *Current Opinion in Genetics & Development* **2004**; 14: 264-270

Russell RK, Satsangi J: IBD: a family affair. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **2004**; 18: 525-539

Rutschmann S, Kilinc A, Ferrandon D: Cutting edge: The Toll pathway is required for resistance to Gram-positive bacterial infections in Drosophila. *J Immunol* **2002**; 168: 1542-1546

Sandborn WJ, Tremaine WJ, Offord KP, Lawson GM, Petersen BT, Batts KP, Croghan IT, Dale LC, Schroeder DR, Hurt RD: Transdermal nicotine for mildly to moderately active ulcerative colitis – a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* **1997**; 126: 364-371

Sandborn WJ, Loftus EV Jr, Colombel JF, Fleming KA, Seibold F, Homburger Ha, Sendid B, Chapman RW, Tremaine WJ, Kaul DK, Wallace J, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Targan SR: Evaluation of serologic disease markers in a population-based cohort of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **2001**; 7: 192-201

Sartor RB: Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **1997**; 2: S5-S11

Sartor RB: Microbial factors in the pathogenesis of Crohn's disease, ulcerative colitis, and experimental intestinal inflammation. In: Kirsner JB, ed. *Inflammatory Bowel Disease*, 5th ed. Philadelphia, PA: WB Sanders; **1999**: 153-178

Sartor RB: Does Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis cause Crohn's disease? *Gut* **2005**; 54: 896-898

Sartor RB: Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice* **2006**; 3: 390-407

Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Shimoyama T, Furuyama J: Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease. *Immunogenetics* **2002**; 53: 1020-1027

Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell KP: Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* **1996a**; 38: 738-741

Satsangi J, Landers CJ, Welsh KI, Koss K, Targan S, Jewell DP: The presence of anti-neutrophil antibodies reflects clinical and genetic heterogeneity within inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **1998**; 4: 18-2

Satsangi J, Parkes M, Louis E, Hashimoto L, Kato N, Welsh K, Terwilliger JD, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP: Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12. *Nat Genet* **1996b**; 14: 199-20

Satsangi J, Welsh KI, Bunce M, Julier C, Farrant JM, Bell JI, Jewell DP: Contribution of genes of the major histocompatibility complex to susceptibility and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Lancet* **1996c**; 347: 1212-121

Satsangi J, Morecroft, Shah NB, Nimmo E: Genetics of inflammatory bowel disease: scientific and clinical implications. *Best Practice & Research clinical Gastroenterology* **2003**; 17: 3-18

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF: The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus and implications. *Gut* **2006**; 55: 749-753

Schinella RA, Grego A, Cobert BT, Denmark LW, Cox RP: Hermansky-Pudlak syndrome with granulomatous colitis. *Ann Intern Med* **1980**; 92: 20-23

Schreiber S, Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Stoll M, Fölsch UR: Genetik und Umwelt. *Der Internist* **2002**; 43: 1335-134

Schroell-Metzger B, Dicato M, Bosseler M, Berchem G: Comparison of standard PCR and the LightCylertechnique to determine the thrombophilic mutations: an efficiency and cost study. *Clin Chem Lab Med* **2003**; 41: 482-485

Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB: Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* **2002**; 8: 71-80

Schuppan D, Hahn EG: MMPs in the gut: inflammation hits the matrix. *Gut* **2000**; 47: 12-14

Schwab M, Schaeffeler E, Marx C, From MF, Kaskas B, Methler J, Stange E, Herfarth H, Schoelmerich J, Gregor M, Walker S, Cascorbi I, Roots I, Brinkmann U, Zanger UM, Eichelbaum M: Association between the C3435T MDR1 gene polymorphism and susceptibility for ulcerative colitis. *Gastroenterology* **2003**; 124: 26-33

Schwalbe RA, Dahlback B, Coe JE, Nelsestuen GL: Pentraxin family of proteins interact specifically with phosphorylcholine and/or phosphorylethanolamine. *Biochemistry* **1992**; 31: 4907-4915

Seeger D, Rosenstiel P, Pfahler H, Pfefferkorn P, Nikolaus S, Schreiber S: Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease. *Gut* **2001**; 48: 326-332

Seibold F, Mork H, Tanza S, Muller A, Holzhuber C, Weber P, Scheurlen M: Pancreatic autoantibodies in Crohn's disease: a family study. *Gut* **1997**; 40: 481-48

Seibold F, Slametschka D, Gregor M, Weber P: Neutrophil antibodies: a genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterology* **1994**; 107: 532-536

Seibold F, Stich O, Hufnagel R, Kamil S, Scheurlen M: Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in inflammatory bowel disease: a family study. *Scand J Gastroenterol* **2001**; 36: 196-201

Sendid B, Quinton JF, Charrier G, Goulet O, Cortot A, Grandbastien B, Poulain D, Colombel JF: Anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **1998**; 93: 1306-1310

Shanahan F, Duerr RH, Rotter JJ, Yag H, Sutherland LR, McElree C, Landers CJ, Targan SR: Neutrophil autoantibodies in ulcerative colitis: familial aggregation and genetic heterogeneity. *Gastroenterology* **1992**; 103: 456-461

Shanahan F: Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *Am J Physiol* **2000**; 178: G191-G196

Shanahan F: Crohn's disease. *Lancet* **2002**; 359: 62-69

Shaw SH, Hampe J, White R, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S: Stratification by CARD15 variant genotype in a genome-wide search for inflammatory bowel disease susceptibility loci. *Hum Genet* **2003**; 113: 514-521

Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y: The suppressive effect of Bifidobacteria on Bacteroides vulgatus, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* **2003**; 47: 371-378

Shih DQ, Targan SR: Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **2008**; 14: 390-400

Shoda R, Matsueda K, Yamato S, Umeda N: Epidemiologic analysis of Crohn disease in Japan: increased dietary intake of n-6 polyunsaturated fatty acids and animal protein relates to the increased incidence of Crohn disease in Japan. *Am J Clin Nutr* **1996**; 63: 741-745

Silverberg MS, Mirea L, Bull SB, Murphy JE, Steinhart AH, Greenberg GR, McLeod RS, Cohen Z, Wade JA, Siminovitch KA: A population- and family-based study of Canadian families reveals association of HLA DRB1*0103 with colonic involvement in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **2003**; 9: 1-9

Sitaraman SV, Klapproth JM, Moore DA 3rd, Landers C, Targan S, Williams IR, Gewirtz AT: Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2005**; 288: G403-G406

Solomon MJ, Schnitzler M: Cancer and inflammatory bowel disease: Bias, Epidemiology, Surveillance, and Treatment. *World J Surg* **1998**; 22: 352-358

Sonnenberg A, McCarty DJ, Jacobsen SJ: Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* **1991**; 100: 143-149

Spiekermann GM, Walker WA: Oral tolerance and its role in clinical disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **2001**; 32: 237-255

Stallmach A, Carstens O: Role of Infections in the manifestation or reactivation of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **2002**; 8: 213-218

Stange EF, Travis SP, Vermeire S, Beglinger C, Kupcinkas L, Geboes K, Barakauskiene A, Villanacci V, von Herbay A, Warren BF, Gasche C, Tilg H, Schreiber SW, Schölmerich J, Reinisch W: European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **2006**; 55: i1-i15

Stenson WF: Toll-like receptors and intestinal epithelial repair. *Current Opinion in Gastroenterology* **2008**; 24: 103-107

Stocker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Finkbeiner H, Stocker K, Jantschek G, Scriba PC: Autoimmunity to pancreatic juice in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* **1987**; 139: 41-52

Stokkers PC, Huibregtse K Jr, Leegwater AC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ: Analysis of a positional candidate gene for inflammatory bowel disease: NRAMP2. *Inflamm Bowel Dis* **2000**; 6: 92-98

Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ: HLA-DR an -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut* **1999**; 45: 395-401

Stoneking M: Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past... *Nature* **2001**; 409: 821-822

Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S: Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* **2004**; 36: 476-480

Strober W, Fuss IJ, Blumberg RS: The Immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* **2002**; 20: 495-549

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

Subhani J, Montgomery SM, Ounder RE, Wakefield AJ: Concordance rates of twins and siblings in inflammatory bowel disease. *Gut* **1998**; 42: A40

Sutton CL, Yang H, Li Z, Rotter JI, Targan SR, Braun J: Familial expression of anti-Saccharomyces cerevisiae mannan antibodies in affected and unaffected relatives of patients with Crohn's disease. *Gut* **2000**; 46: 58-63

Sventoraityte J, Zvirbliene A, Franke A, Kwiatkowski R, Kindelis G, Kupcinkas L, Schreiber S: NOD2, IL23R and ATG16L1 polymorphisms in Lithuanian patients with inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **2010**; 16(3): 359-364

- Swidsinski A**, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H: Mucosal Flora in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* **2002**; 122: 44-54
- Swidninski A**, Loening-Baucke V, Herber A: Mucosal flora in Crohn's disease and Ulcerative colitis – an overview. *J Physiol Pharmacol* **2009**; 60 Suppl 6:61-71
- Tabor HK**, Risch, NJ, Myers RM: Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat Rev Genet* **2002**; 3: 391-397
- Takeda K**, Akira S: Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes to Cells* **2001**; 6: 733-742
- Takeda K**, Akira S: Microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science* **2004a**; 34: 73-82
- Takeda K**, Akira S: TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology* **2004b**; 16: 3-9
- Takeda K**, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* **2003**; 21: 335-380
- Takeuchi O**, Kawai T, Sanjo H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Takeda K, Akira S: TLR6: a novel member of an expanding Toll-like receptor family. *Gene* **1999**; 231: 59-65
- Taurog JD**, Richardson JA, Croft JT, Simmons WA, Zhou M, Fernandez-Sueiro JL, Balish E, Hammer RE: The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J Exp Med* **1994**; 180: 2359-2364
- Taylor KD**, Yang H, Rotter JJ: Inflammatory bowel disease II. Gene Mapping. *Molecular Genetics and Metabolism* **2001**; 74: 22-44
- Tenesa A**, Noble C, Satsangi J, Dunlop M: Association of DLG5 and inflammatory bowel disease across populations. *Eur J Hum Genet* **2006**; 14: 259-260
- The MHC sequencing consortium**: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* **1999**; 401: 921-923
- Thomas GA**, Rhodes J, Mani V, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C: Transdermal nicotine as maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* **1995**; 332: 988-992
- Thomas GA**, Rhodes J, Rangunath K, Mani V, Williams GT, Newcombe RG, Russell MA, Feyerabend C: Transdermal nicotine compared with oral prednisolone therapy for active ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **1996**; 8: 769-776
- Thompson NP**, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ: Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* **1996**; 312: 95-96
- Thompson-Chagoyan OC**, Maldonado J, Gil A: Aetiology of inflammatory bowel disease (IBD): Role of intestinal microbiota and gut-associated lymphoid tissue immune response. *Clinical Nutrition* **2005**; 24: 339-352

- Timmer A:** Environmental influences on inflammatory bowel disease manifestations. *Dig Dis* **2003**; 21: 91-104
- Traub S,** Kubasch N, Morath S, Kresse M, Hartung T, Schmidt RR, Hermann C: Structural requirements of synthetic muropeptides to synergize with lipopolysaccharide in cytokine induction. *J Biol Chem* **2004**; 279: 8694-8700
- Travis SP,** Stange EF, Lémann M, Öresland T, Chowers Y, Forbes A, D'Haens G, Kitis G, Cortot A, Prantera C, Marteau P, Colombel JF, Gionchetti P, Bouhnik Y, Turet E, Kroesen J, Starlinger M, Mortensen NJ: European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut* **2006**; 55: i16-i35
- Treacher DF,** Jewell DP: Yersinia colitis associated with Crohn's disease. *Postgrad Med J* **1985**; 61: 173-174
- Tremelling M,** Waller S, Bredin F, Greenfield S, Parkes M: Genetic variants in TNF- α but not DLG5 are associated with inflammatory bowel disease in a large United Kingdom cohort. *Inflamm Bowel Dis* **2006**; 12: 178-184
- Török HP,** Glas J, Lohse P, Folwaczny C: Alterations of the CARD15/NOD2 gene and the impact on management and treatment of Crohn's disease patients. *Dig Dis* **2003**; 21: 339-345
- Török HP,** Glas J, Tonenchi L, Lohse P, Müller-Myhsok B, Limbersky O, Neugebauer C, Schnitzler F, Seiderer J, Tillack C, Brand S, Brunnler G, Jagiello P, Epplen JT, Griga T, Klein W, Schiemann U, Folwaczny M, Ochsenkuhn T, Folwaczny C: Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter gene in Crohn's disease. *Gut* **2005**; 54: 1421-1427
- Török HP,** Glas J, Tonenchi L, Mussack T, Folwaczny C: Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* **2004a**; 112: 85-91
- Török HP,** Glas J, Tonenchi L, Bruennler G, Folwaczny M, Folwaczny C: Crohn's disease is associated with a Toll-like receptor 9 polymorphism. *Gastroenterology* **2004b**; 127: 365-366
- Tsalenko A,** Ben-Dor A, Cox N, Yakhini Z: Methods for analysis and visualization of SNP genotype data for complex diseases. *Pacific Symposium on Biocomputing* **2003**; 8: 548-561
- Tümer Z,** Croucher PJP, Jensen LR, Hampe J, Hansen C, Kalscheuer V, Ropers HH, Tommerup N, Schreiber S: Genomic structure, chromosome mapping and expression analysis of the human AVIL gene, and its exclusion as a candidate for locus for inflammatory bowel disease at 12q13-14 (IBD2). *Gene* **2002**; 288: 179-185
- Twyman RM,** Primrose SB: Techniques patents for SNP genotyping. *Pharmacogenomics* **2003**; 4: 67-79
- Tysk C,** Lindberg E, Jarnerot G, Floderus-Myrhed B: Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* **1988**; 29: 990-996
- Ulevitch RJ,** Mathison JC, da Silva Correia J: Innate immune responses during infection. *Vaccine* **2004**; 22S: S25-S30

- Urcelay E**, Medoza JL, Martinez A, Fernandez L, Taxonera C, Diaz-Rubio M, de la Concha EG: IBD5 polymorphisms in inflammatory bowel disease: association with response to infliximab. *World J Gastroenterol* **2005**; 11: 1187-1192
- Vavassori P**, Borgiani P, D'Apice MR, De Negrìs F, Del Vecchio Blanco G, Monteleone I, Biancone L, Novelli G, Pallone E: 3020insC mutation within the NOD2 gene in Crohn's disease: frequency and association with clinical pattern in an Italian population. *Dig Liver Dis* **2002**; 34: 153
- Vermeire S**, Joossens S, Peeters M, Monsuur F, Marien G, Bossuyt X, Groenen P, Vlietinck R, Rutgeerts P: Comparative study of ASCA (Anti-Saccharomyces cerevisiae antibody) assay in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **2001**; 120: 827-833
- Vermeire S**, Wild G, Kocher K, Cousineau J, Dufresne L, Bitton A, Langelier D, Pare P, Lapointe G, Cohen A, Daly MJ, Rioux JD: CARD15 genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship and haplotype structure. *Am J Hum Genet* **2002**; 71: 74-83
- Vermeire S**: NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2004a**; 18: 569-575
- Vermeire S**, Rutgeerts P, van Steen K, Joossens S, Claessens G, Pierik M, Peeters M, Vlietinck R: Genome wide scan in a Flemish inflammatory bowel disease population: support for the IBD4 locus, population heterogeneity and epistasis. *Gut* **2004b**; 53: 980-986
- Vermeire S**, Pierik M, Hlavaty T, Claessens G, van Schuerbeeck N, Joossens S, Ferrante M, Henckaerts L, Bueno de Mesquita M, Vlietinck R, Rutgeerts P: Association of the organic cation transporter risk haplotype with perianal penetrating Crohn's disease but not with susceptibility to IBD. *Gastroenterology* **2005**; 129: 1845-1853
- Verthelyi D**, Zeuner RA: Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9. *Trends in Immunology* **2003**; 24: 519-522
- Viscido A**, Aratari A, Maccioni F, Signore A, Caprilli R: Inflammatory bowel diseases: clinical update or practical guidelines. *Nucl Med Commun* **2005**; 26: 649-655
- Vollmer J**, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM: Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* **2004**; 34: 251-262
- Wagner H**: Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Current Opinion in Microbiology* **2002**; 5: 62-69
- Wakefield AJ**, Ekblom A, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE: Crohn's disease: pathogenesis and persistent measles virus infection. *Gastroenterology* **1995**; 108: 911-916
- Waller S**, Tremelling M, Bredin F, Godfrey L, Howson J, Parkes M: Evidence for association of OCTN genes and IBD5 with ulcerative colitis. *Gut* **2006**; 55: 809-814
- Watson JL**, McKay DM: The immunophysiological impact of bacterial CpG DNA on the gut. *Clinical Chimica Acta* **2005**; 364: 1-11

Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Schwab M, Schäffeler E, Schlee M, Herrlinger KR, Stallmach A, Noack F, Fritz P, Schröder JM, Bevins CL, Fellermann K, Stange EF: NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal α -defensin expression. *Gut* **2004**; 53: 1658-1664

Werling D, Jungi TW: Toll-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **2003**; 91: 1-12

Wild GE, Rioux JD: Genome scan analyses and positional cloning strategy in IBD: successes and limitations. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **2004**; 18: 541-553

Williams CN, Kocher K, Lander ES, Daly MJ, Rioux JD: Using a genome-wide scan and meta-analysis to identify a novel IBD locus and confirm previously identified IBD loci. *Inflamm Bowel Dis* **2002**; 8: 375-381

Williams MD, Omran ML, Gordon GL: Biologic therapy in Crohn's disease. *Mo Med* **2009**; 106(5): 356-360

Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V: Survival and cause-specific mortality in ulcerative colitis: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County. *Gastroenterology* **2003**; 125: 1576-1582

Wolters FL, Russel MG, Sijbrandij J, Schouten LJ, Odes S, Riis L, Munkholm P, Bodini P, O'Morain C, Mouzas IA, Tsianos E, Vermeire S, Monteiro E, Limonard C, Vatn M, Fornaciari G, Pereira S, Moum B, Stockbrügger RW and on behalf of the European Collaborative study group on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD): Crohn's disease: increased mortality 10 years after diagnosis in a Europe-wide population based cohort. *Gut* **2006**; 55: 510-518

Wu X, Huang W, Prasad PD, Seth P, Rajan DP, Leibach FH, Chen J, Conway SJ, Ganapathy V: Functional characteristics and tissue distribution pattern of organic cation transporter 2 (OCTN2), an organic cation/carnitine transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **1999**; 290: 1482-1492

Wu X, George RL, Huang W, Wang H, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V: Structural and functional characteristics and tissue distribution pattern of rat OCTN1, an organic cation transporter, cloned from placenta. *Biochem Biophys Acta* **2000**; 1466: 315-327

Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiars A, van Bodegraven AA, Pena AS: Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* **2003**; 131: 446-450

Yamada R, Yamamoto K: Recent findings on genes associated with inflammatory disease. *Mutation Research* **2005**; 573: 136-151

Yamamoto S, Ma X: Role of Nod2 in the development of Crohn's disease. *Microbes Infect* **2009**; 11(12): 912-918

Yamamoto-Furusho JK: Genetic factors associated with the development of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **2007a**; 13: 5594-5597

Yamamoto-Furusho JK, Korzenik JR: Crohn's disease: Innate immunodeficiency? *World Journal of Gastroenterology* **2006**; 12: 6751-6755

Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK: Innate immunity in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **2007b**; 13:5577-5580

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Kazumori T, Nakamura Y: Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. *J Hum Genet* **2002**; 47: 469-47

Yamazaki K, Takazoe M, Tanaka T, Ichimori T, Saito S, Iida A, Onouchi Y, Hata A, Nakamura Y: Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease. *J Hum Genet* **2004**; 49: 664-668

Yang H, McElree C, Roth MP, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI: Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews. *Gut* **1993**; 34: 517-524

Yang H, Plevy SE, Taylor K, Tyan D, Fischel-Ghodsian N, McElree C, Targan SR, Rotter JI: Linkage of Crohn's disease to the major histocompatibility complex region is detected by multiple non-parametric analyses. *Gut* **1999**; 44: 519-526

Yang H, Rotter JI: Subclinical markers of human inflammatory bowel disease. *Can J Gastroenterol* **1995**; 9: 161-167

Yang H, Taylor KD, Rotter JI: Inflammatory bowel disease. I. Genetic epidemiology. *Mol Genet Metab* **2001**; 74: 1-21

Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H: Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun* **2001**; 69: 2045-2053

Yang SK, Loftus EV Jr., Sandborn WJ: Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Inflammatory Bowel Diseases* **2001**; 7: 260-270

Yates VM, Watkinson G, Kelman A: Further evidence for an association between psoriasis, Crohn's disease and ulcerative colitis. *Br J Dermatol* **1982**; 106: 323-330

Yuan Q, Walker WA: Innate immunity of the gut: Mucosal defense in health and disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **2004**; 38: 463-473

Zhang G, Ghosh S: Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem* **2002**; 277: 7059-7065

Zhang H, Liu L, Wang X, Gruen JR: Guideline for data analysis of genomewide association studies. *Cancer Genomics Proteomics* **2007**; 4: 27-34

Zheng CQ, Hu GZ, Zeng ZS, Lin LJ, Gu GG: Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. *World J Gastroenterol* **2003**; 9: 1646-1656

Zhou Z, Lin XY, Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Levine J, Katz S, Silver J: Variation at NOD2/CARD15 in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol* **2002**; 97: 3095-3101

Zlotogora J, Zimmerman J, Rachmilewitz D: Crohn's disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology* **1990**; 99: 268-290

Zoniten-Mekki L, Kharrat M, Karoni S, Serghimi M, Fekik M, Matri S, Kallel L, Boubaker J, Filali A, Chaabouni H: TLR4 polymorphisms in Tunisian patients with Crohn's disease: genotype-phenotype correlation. *BMC Gastroenterol* **2009**; 9: 62

Zouali H, Chamaillard M, Lesage S, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, Montaque S, Gassull M, Christensen S, Finkel Y, Gower-Rousseau C, Modigliani R, Macry J, Selinger-Leneman H, Thomas G, Hugot JP: Genetic refinement and physical mapping of a chromosome 16q candidate region for inflammatory bowel disease. *Eur J Hum Genet* **2001**; 9: 731-742

Zouali H, Lesage S, Merlin F, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Christensen S, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Chamaillard M, Thomas G, Hugot JP: CARD4/NOD1 is not involved in inflammatory bowel disease. *Gut* **2003**; 52: 71-74

7. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ilona Marie Charlotte Endres
Geburtsdatum: 15. April 1982
Geburtsort: Kaufbeuren

Ausbildung

Schulbildung

1988 – 1992 Grundschole Mauerstetten
1992 – 2001 Mariengymnasium Kaufbeuren

Studium

10/2001 – 06/2008 Studium der Humanmedizin an der LMU München

- Ärztliche Vorprüfung 09/2003
- Praktisches Jahr 12/2006 – 12/2007
- Ärztliche Prüfung 06/2008
- Approbation 08/2008

Promotion

02/2005 – 07/2006 Promotionsstudium Molekulare Medizin an der LMU München

Beruflicher Werdegang

06/2006 – 12/2008 Studentische Mitarbeiterin am Klinikum Innenstadt der LMU München
DRG-Kodierung mehrerer internistischer Stationen an der Medizinischen Poliklinik des Klinikums der LMU München
seit 01/2009 Assistenzärztin der Inneren Medizin am Zentralklinikum Augsburg

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Christian Folwaczny danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie die Unterstützung und Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Helga-Paula Török für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Promotion. Ihr Verständnis für Probleme und die hilfreichen Tipps und Ratschläge haben mir die Arbeit erleichtert und ein stetiges Vorankommen ermöglicht. Ohne sie und ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für die Ermöglichung meiner Ausbildung, das große Vertrauen und die großzügige Unterstützung bei all meinen Aufgaben.

Ich danke allen, die mich tatkräftig während meiner Promotion unterstützt haben.