

Aus dem gastroenterologischen Labor  
der Medizinischen Poliklinik der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff

Positionelle und funktionelle Kandidatengene  
bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

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

vorgelegt von  
Mirjam Osthoff  
aus Dachau

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. C. Folwaczny

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Sackmann  
Prof. Dr. O. Steinlein

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: \_\_\_\_\_

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.2005

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vorab wie folgt veröffentlicht:

Radlmayr M, Török H-P, Martin K, Folwaczny C.  
The c-insertion mutation of the NOD 2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease.  
Gastroenterology (2002) 122: 2091-2092.

Martin K, Radlmayr M, Borchers R, Heinzlmann M, Folwaczny C.  
Candidate genes colocalized to linkage regions in inflammatory bowel disease.  
Digestion (2002) 66: 121-126.

<b>Gliederung</b>	<b>Seite</b>
<b>1. Einleitung</b>	6
<b>1.1 Einteilung und klinischer Verlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</b>	6
<b>1.2 Epidemiologie</b>	9
<b>1.3 Pathogenese</b>	11
1.3.1 Genetischer Hintergrund	11
1.3.2 Autoimmunmechanismen	13
1.3.3 Infektiöse Genese	16
1.3.4 Immunregulationsstörung gegenüber luminalen Antigenen	22
1.3.5 Äußere Einflüsse	24
<b>1.4 Positionelle und funktionelle Kandidatengene</b>	24
1.4.1 EGFR	24
1.4.2 Motilin	27
1.4.3 NOD2	29
<b>1.5 Zielsetzung</b>	31
<b>2. Patienten und Methoden</b>	32
<b>2.1 Studienpopulation</b>	32
<b>2.2 Aufarbeitung der Blutproben, Gewinnung der genomischen DNA</b>	33
<b>2.3 Typisierung der EGFR Allele</b>	34
2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.3.2 Restriktionsverdau	35
2.3.3 Gelelektrophorese und Charakterisierung	35
<b>2.4 Typisierung der Motilin Allele</b>	36
2.4.1 PCR-Amplifikation	36
2.4.2 Restriktionsverdau	37

2.4.3	Gelelektrophorese und Charakterisierung	37
<b>2.5</b>	<b>Typisierung der NOD2 Allele</b>	<b>38</b>
2.5.1	PCR-Amplifikation	38
2.5.2	Gelelektrophorese und Charakterisierung	39
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung und verwendete Software</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
3.1.	Häufigkeitsverteilung der EGFR Allele	41
3.2.	Häufigkeitsverteilung der Motilin Allele	42
3.3.	<b>NOD2/CARD 15</b>	<b>43</b>
3.3.1	Frequenz der C-insertions Mutation	43
3.3.2	Genotyp-Phänotyp Korrelation	44
3.4.	<b>Korrelation des p-ANCA Status zu entsprechenden Genotypen</b>	<b>46</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
4.1.	EGFR	48
4.2.	Motilin	52
4.3.	NOD2/CARD 15	55
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>63</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>77</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>78</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Einteilung und klinischer Verlauf der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Charakteristisch für Morbus Crohn und Colitis ulcerosa sind entzündliche Veränderungen der Mukosa im Gastrointestinaltrakt sowie mitunter bestehende extraintestinale Symptome. Trotz vieler Gemeinsamkeiten im klinischen Bild wird im Folgenden vor allem auf die Charakteristika der einzelnen Entitäten eingegangen.

Die entzündlichen Reaktionen mit ödematöser Schwellung, Exsudation und Ulzeration beschränken sich bei der Colitis ulcerosa auf die Schleimhaut des Kolons. Typischerweise ist das Rektum betroffen. In variabler Ausdehnung verläuft der Krankheitsprozess kontinuierlich nach proximal, bis hin zur Pancolitis. In ca. 10 % der Fälle findet sich eine Mitbeteiligung des terminalen Ileums, die als backwash Ileitis bezeichnet wird. Ob pathogenetisch tatsächlich ein Reflux von Koloninhalt über die Ileozökalklappe für die entzündlichen Veränderungen verantwortlich ist, ist letztlich nicht geklärt (70). Das histopathologische Bild zeigt eine Infiltration der Lamina propria mit Granulozyten und Lymphozyten, Kryptenabszesse, eine Abnahme der Becherzeldichte und Ulzerationen der Schleimhaut.

Die führenden Symptome der Colitis ulcerosa sind Blut- und Schleimbeimengungen zum Stuhl. Meist ist die Stuhlfrequenz erhöht, und Patienten berichten über krampfartige Bauchschmerzen, vor allem während der Defäkation.

Der klinische Verlauf nach Auftreten der ersten Symptome ist variabel. In einer prospektiven Studie in Norwegen zeigte sich eine 50%ige kumulative Rückfallrate im ersten Jahr nach Diagnosestellung und ein erhöhtes Operationsrisiko für Patienten mit Pancolitis im Vergleich zu Patienten mit linksseitiger Kolitis (111).

Komplikationen der Colitis ulcerosa sind unter anderem Gewichtsverlust durch verminderte Nahrungsaufnahme auf Grund abdomineller Beschwerden, jedoch liegt keine Malassimilation vor, Fieber und die Entwicklung eines toxischen Megacolons. Eine der gefährlichsten Komplikationen der Colitis ulcerosa ist die Entstehung eines kolorektalen Karzinoms. Zu den Risikofaktoren zählen junges

Alter bei Erstdiagnose (13), das Ausmaß des Kolonbefalls, sowie die Krankheitsdauer (133). Das Risiko von 1 - 5% acht bis zehn Jahre nach Diagnosestellung steigt auf 9 - 42% bei dreißigjährigem Krankheitsverlauf (158). Bei gleichzeitig bestehender primär sklerosierender Cholangitis oder einer backwash Ileitis potenziert sich das Risiko an einem kolorektalem Carcinom zu erkranken (70,157). Extraintestinale Manifestationen schließen Arthralgien oder Arthritiden, Augenbefall im Sinne einer Uveitis oder Iritis, Pyoderma gangraenosum und primär sklerosierende Cholangitis mit ein.

Im Gegensatz zur Colitis ulcerosa können beim Morbus Crohn alle Abschnitte des Gastrointestinaltrakts von entzündlichen Veränderungen betroffen sein. Typisch ist der segmentale Befall mit gesunden Darmabschnitten neben entzündlichen Läsionen.

Am häufigsten liegt eine auf die Ileozökalregion beschränkte Ileocolitis vor. Neben dem seltenen isoliertem Dünndarmbefall, kommt auch ein isolierter Dickdarmbefall vor.

Charakteristisch ist, dass der Entzündungsprozess alle Wandschichten des Darmes ergreifen kann. Das histopathologische Bild ist durch ein vorwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten bestehendes entzündliches Infiltrat gekennzeichnet mit aphtösen Ulzerationen und tiefen Fissuren im weiteren Verlauf der Erkrankung. In bis zu der Hälfte der Patienten finden sich nicht-verkäsende Granulome in der Submukosa.

Durch den transmuralen Entzündungsprozess kann es zum fibrotischen Umbau in der Darmwand kommen mit konsekutiver stenotischer Einengung des Darmlumens, aber auch zur Ausbildung von Fisteln zwischen unterschiedlichen Darmabschnitten oder anderen Hohlorganen, z.B. Blase. Je nach vorherrschendem klinischen Bild unterscheidet man den fibrostenotischen Subtyp, den fistulierenden Subtyp und den inflammatorischen Subtyp, der durch ein Fehlen von Stenosen und Fisteln gekennzeichnet ist (141).

Die klinische Symptomatik ist je nach Ausmaß und Lokalisation der entzündlichen Veränderungen uneinheitlich.

Die meisten Patienten klagen über Diarrhöen und Bauchschmerzen, häufig auch über Fieber und Gewichtsverlust. Ist das terminale Ileum betroffen, kann dies zu einem Vitamin B12 Mangel führen.

Der Verlauf nach Diagnosestellung, meist in Schüben, variiert von Patient zu Patient. Die kumulative Rückfallrate im ersten Jahr betrug 47% und die Operationsrate bis zu 18% in einer prospektiven Studie in Norwegen (111).

Bei ausgeprägter Einengung des Darmlumens durch fibrostenotische Vernarbungen kann es zu Passagebehinderungen bis hin zum Ileus kommen. Weitere Komplikationen entstehen durch Fistelbildung und Abszessformation.

Morbus Crohn Patienten mit ausgedehntem oder isolierten Dickdarmbefall haben ein erhöhtes Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken. Dauer und Ausdehnung der Erkrankung und junges Alter bei Erstdiagnose sind nachgewiesene Risikofaktoren (42). Das relative Risiko für ein Kolonkarzinom entspricht dem bei Patienten mit Colitis ulcerosa, wenn Dauer und Ausdehnung des Dickdarmbefalls vergleichbar sind. Das Risiko für Karzinome des Dünndarms scheint ebenfalls erhöht zu sein (158). Weiterhin besteht ein erhöhtes Risiko für Karzinome der Leber und der Gallenwege (13). Trotz dieses erhöhten Risikos für Karzinome ist die Gesamtmortalität bei Patienten mit Morbus Crohn, als auch bei Patienten mit Colitis ulcerosa, der in der allgemeinen Bevölkerung vergleichbar, da es sich bei der erwähnten karzinomatösen Entartung um absolut gesehen seltene Ereignisse handelt (107).

## 1.2. Epidemiologie

In Europa liegt die durchschnittliche nach Alter und Geschlecht standardisierte Rate an Neuerkrankungen für die Colitis ulcerosa bei 10,4/100 000 pro Jahr. Die höchste Inzidenz von 24,5/100 000 pro Jahr weist Island auf, die niedrigste Inzidenz Süd-Portugal (1,6/100 000 pro Jahr). Generell ist ein Nord-Süd-Gefälle zu verzeichnen, das nicht allein durch bessere diagnostische Möglichkeiten in nördlichen Ländern, also einen Observationsbias, zu erklären ist (152).

Die höchste altersspezifische Inzidenzrate weist die Gruppe der 20-39jährigen auf (62).

In Manitoba, Canada, betrug die Inzidenz zwischen 1989-1994 für die Colitis ulcerosa 14,3/100 000 pro Jahr (14).

Trotz vereinzelter Berichte zunehmender Inzidenzen, z.B. Island, Stockholm und abnehmender Inzidenzen, z.B. Minnesota, New York, ist in den letzten Jahrzehnten die Rate an Neuerkrankungen in den meisten westlichen Gebieten weitgehend stabil geblieben (80).

Weltweit gesehen besteht neben einem Nord-Süd-Gefälle auch ein West-Ost-Gefälle. In Japan wurde 1991 eine Inzidenz von 1,95/100 000 pro Jahr festgestellt, die damit weit unter dem europäischen Durchschnitt liegt. Mit wachsendem Einfluss des westlichen Lebens- und Ernährungsstils in asiatischen Ländern war in den letzten Jahrzehnten ein steiler Anstieg der Neuerkrankungen an Colitis ulcerosa zu verzeichnen (83, 178).

Die nach Alter und Geschlecht standardisierte Rate an Neuerkrankungen für Morbus Crohn beträgt 5,6/100 000 pro Jahr in Europa. Die höchste Inzidenz mit 9,2/100 000 pro Jahr weisen Maastricht und Nord-West-Frankreich auf, die niedrigste Inzidenz Nord-West-Griechenland mit 0,9/100 000. Ebenso wie für die Colitis ulcerosa ist auch für den Morbus Crohn ein deutliches Nord-Süd-Gefälle erkennbar (152).

Im Vergleich zu Patienten mit Colitis ulcerosa liegt die höchste altersspezifische Inzidenzrate des Morbus Crohn bei jüngeren Patienten, in der Altersgruppe der 20-29jährigen (62).

Die Inzidenz für Morbus Crohn von 14,6/100 000 pro Jahr in Manitoba, Canada, ist vergleichbar der Inzidenz für Colitis ulcerosa in dieser Gegend (14).

Während die Rate an Neuerkrankungen für Colitis ulcerosa in Europa deutlich über der für Morbus Crohn liegt, sind in Nord-Amerika etwa gleich viele Neuerkrankungen an Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn zu verzeichnen (80).

In Malmö, Schweden, nahm die Inzidenz von Morbus Crohn von 3,5/100 000 pro Jahr von 1958-1965 auf 6,0/100 000 pro Jahr innerhalb der folgenden acht Jahre zu (22). Auch in Schottland stieg die Inzidenz in den Jahren 1961-1970 an (155). Neuere epidemiologische Daten bestätigen den ansteigenden Trend der Inzidenzraten für Morbus Crohn nicht nur in Europa, sondern auch in Nord-Amerika und Japan (80).

Die Prävalenzraten für Colitis ulcerosa und Morbus Crohn weisen große regionale Unterschiede auf. In Europa werden Raten von 21-268/100 000 pro Jahr für Colitis ulcerosa und von 9-156/100 000 pro Jahr für Morbus Crohn gemeldet. Die Prävalenz der Colitis ulcerosa liegt generell über der des Morbus Crohn (80).

### **1.3. Pathogenese**

Obwohl die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unbekannt ist, weisen viele klinische und experimentelle Studien darauf hin, dass sowohl genetische als auch epigenetische Faktoren eine Rolle spielen. Zur Pathogenese werden mehrere Theorien diskutiert: die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen als klassische Autoimmunkrankheit, als Infektionskrankheit oder als Störung der Immunantwort auf bestimmte luminale Antigene in einem genetisch prädisponierten Individuum.

#### **1.3.1. Genetischer Hintergrund**

Ein bekanntes Phänomen ist das gehäufte Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in bestimmten Familien. Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weisen in 10-15% eine positive Familienanamnese auf (166). Erstgradige Angehörige haben ein 15fach erhöhtes Risiko an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken im Vergleich zur Normalbevölkerung (17). Familien mit an Colitis ulcerosa und Morbus Crohn erkrankten Mitgliedern kommen vor, jedoch erkranken in 73-89% betroffene Familienangehörige an derselben Erkrankung (17).

Somit existieren möglicherweise Faktoren im genetischen Hintergrund, die sowohl für Morbus Crohn als auch für Colitis ulcerosa prädisponieren.

Da erstgradige Familienangehörige nicht nur die genetische Verwandtschaft teilen, sondern meist auch ähnliche Umweltbedingungen, spricht ein gehäuftes Vorkommen einer Erkrankung nicht notwendigerweise für eine vererbte Disposition. Für diese vererbte Disposition spricht allerdings das nicht gehäufte Auftreten von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bei Ehepartnern und in der Adoptivfamilie Erkrankter bzw. vice versa (147). Ebenso deutet das erhöhte Erkrankungsrisiko Verwandter von Erkrankten aus jüdischen Familien im Vergleich zu nicht-jüdischen Familien auf eine genetische Veranlagung hin (177).

Die eindeutigsten Hinweise für eine genetische Veranlagung geben Zwillingsstudien. Im Vergleich von Konkordanzraten zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen lässt sich der genetische Einfluss quantifizieren.

In schwedischen Zwillingspaaren zeigte sich eine Konkordanzrate von 58,3% für Morbus Crohn und 6,3% für Colitis ulcerosa. Unter den dizygoten Zwillingspaaren lag die Konkordanzrate nur bei 3,9% für Morbus Crohn und 0% für Colitis ulcerosa (167). Vergleichbar waren die Konkordanzraten bei einer Studie an dänischen Zwillingspaaren, wo für monozygote Zwillinge eine Konkordanzrate von 58,3% für Morbus Crohn und von 18,2% für Colitis ulcerosa errechnet wurde (119). Auch bei britischen Zwillingspaaren konnte eine signifikant höhere Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen als bei dizygoten Zwillingen nachgewiesen werden (162). Die höheren Konkordanzraten bei Zwillingspaaren mit Morbus Crohn im Vergleich zu Zwillingspaaren mit Colitis ulcerosa lassen ein größeres Gewicht des genetischen Einflusses bei Morbus Crohn vermuten.

Dafür spricht auch, dass Verwandte von Patienten mit Morbus Crohn ein höheres Risiko haben im Laufe des Lebens selbst zu erkranken als Verwandte von Patienten mit Colitis ulcerosa (177).

Unter der Annahme der genetischen Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen wurden Studien an Familien mit mehreren betroffenen Mitgliedern durchgeführt, um mögliche klinische Phänotypen zu differenzieren, deren Ausprägung auf der vererbten Disposition beruhen. Bei betroffenen Eltern-Kind-Paaren zeigte sich eine Konkordanzrate von 75% für den Krankheitstyp, von 64% für Ausdehnung und von 70% für extraintestinale Manifestationen. Für betroffene Geschwisterpaare wurden höhere Konkordanzraten von 82% für den Krankheitstyp, von 76% für Ausdehnung und von 84% für extraintestinale Manifestationen nachgewiesen (145). In Studien an von Morbus Crohn betroffenen Familien konnten Konkordanzraten von 49-82% für den klinischen Subtyp, d.h. die stenosierende, fistulierende, inflammatorische Form berechnet werden (12, 32). Diese Beobachtungen können als Hinweis dafür gedeutet werden, dass unterschiedliche klinische Subtypen von Morbus Crohn auf unterschiedlichen genetischen Varianten beruhen.

Dass Morbus Crohn und Colitis ulcerosa polygenetische Erkrankungen sind, wurde durch Kopplungsanalysen belegt. Diese werden folgendermaßen durchgeführt: Die genomische DNA von

Familien mit mehreren erkrankten Personen wird systematisch mittels hochpolymorphen Markern genotypisiert, um Allele zu finden, die bei Erkrankten überzufällig häufig vorkommen. Dies weist auf eine Kopplung zwischen dem markierten Chromosomenabschnitt und dem für die Erkrankung verantwortlichen Gen hin. Die verantwortlichen Genvarianten innerhalb des Chromosomenabschnittes müssen dann in weiteren Untersuchungen identifiziert werden.

Die erste genomweite Kopplungsanalyse 1996 zeigte eine Kopplung von Morbus Crohn und der perizentromerischen Region des Chromosoms 16 auf (74). Diese Kopplungsregion, der Inflammatory bowel disease locus 1 (IBD1), konnte mehrfach bestätigt werden (8, 23, 116), zuletzt durch das IBD International Genetics Consortium (28).

Während die perizentromerische Region des Chromosoms 16 allein für Morbus Crohn prädisponiert, sind Regionen auf den Chromosomen 3, 7 und 12 mit beiden Erkrankungen gekoppelt (146). Für die Region auf Chromosom 12, IBD 2 Locus, wurde eine deutlichere Assoziation mit Colitis ulcerosa als mit Morbus Crohn nachgewiesen (122).

In einzelnen weiteren Studien wurden Kopplungsregionen auf den Chromosomen 1, 3, 4, 6, 14 und 19 beschrieben (30, 39, 66, 68, 97, 134). Einige der Kopplungsregionen konnten durch Folgestudien nicht bestätigt werden.

Ein erfolgversprechender Ansatz die einzelnen Gene zu identifizieren, die für die Kopplung verantwortlich sind, ist die Untersuchung bekannter Gene innerhalb dieser Kopplungsregionen, deren Genprodukte eine Rolle in der Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankungen spielen oder spielen könnten.

### **1.3.2. Autoimmunmechanismen**

Autoimmunologische Mechanismen scheinen in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle zu spielen. Nach wie vor ist kein einzelnes Pathogen identifiziert worden, welches den destruktiven Entzündungsprozess, durch den die Colitis ulcerosa und der Morbus Crohn charakterisiert sind, auslöst. Unterstützt wird die Hypothese eines autoimmunologischen Prozesses durch die Assoziation der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit bekannten

Autoimmunkrankheiten, wie z.B. die primär biliäre Sklerose, und das häufige Auftreten von extraintestinalen Manifestationen (36).

Insbesondere die Colitis ulcerosa, deren entzündlicher Prozess auf das Kolon beschränkt und somit organspezifisch ist, weist Merkmale klassischer Autoimmunkrankheiten auf.

Verschiedene Autoantikörper können im Serum von Patienten mit Colitis ulcerosa nachgewiesen werden. In 50-90% treten perinukleäre antineutrophile cytoplasmatische Autoantikörper (p-ANCA) auf (113). Für pANCA konnten verschiedene Zielantigene identifiziert werden. Häufig sind pANCA gegen Lactoferrin und bactericidal/permeability-increasing protein gerichtet, des weiteren gegen Cathepsin G, Lysozym, HMG1 und HMG2 und Histon H1 (40, 52, 136). Mehrere Untersuchungen stellten einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von pANCA und der Krankheitsaktivität fest (136, 140). In Folgestudien ließ sich diese Assoziation nicht bestätigen (54, 130, 137).

Das Auftreten von pANCA steht nicht in Zusammenhang mit der Krankheitslokalisation bei Patienten mit Colitis ulcerosa, der Einnahme von Medikamenten oder der Dauer der Erkrankung (120, 136).

pANCA sind in 10-30% auch bei Patienten mit Morbus Crohn zu finden. Ihr Vorkommen kennzeichnet Patienten mit Befall des Kolons (169). Entzündliche Veränderungen des Kolons sind jedoch nicht Voraussetzung für das Auftreten von pANCA, da bei Patienten mit Colitis ulcerosa pANCA nach Kolektomie persistieren (123).

Die klinische und pathogenetische Bedeutung dieser Autoantikörper ist nach wie vor nicht geklärt. Der Nachweis von pANCA im Serum von nicht erkrankten Verwandten von Patienten mit Colitis ulcerosa, legte zunächst die Vermutung nahe, pANCA seien Marker einer genetischen Disposition für Colitis ulcerosa. In neueren Studien konnte dies jedoch widerlegt werden (2, 54). Vieles spricht dafür, dass pANCA ein Epiphänomen darstellen und nicht Ursache der chronischen Entzündung sind. Einerseits reagieren pANCA oft gleichzeitig mit mehreren Zielantigenen, sind also unspezifisch, andererseits besteht auch eine Kreuzreaktivität mit bakteriellen Antigenen der normalen Darmflora (31).

Autoantikörper gegen Becherzellen (GAB) lassen sich bei 29-39% der Patienten mit Colitis ulcerosa und bei 30-33% der Patienten mit Morbus Crohn nachweisen (55, 71, 150). Wie anfangs erwähnt, zeichnet sich der typische histopathologische Befund der Colitis ulcerosa durch eine Abnahme der

Becherzellichte aus. Gegen eine alleinige Verursachung der Becherzelldepletion durch eine Autoantikörper getriggerte Reaktion spricht, dass ein Großteil der Patienten keine GAB aufweist. Des weiteren ist das Zielantigen der GAB noch nicht identifiziert. Bei gesunden erstgradigen Angehörigen von Patienten mit Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn finden sich in 21% bzw. 19% ebenfalls GAB. Die Prävalenz von GAB ist in dieser Personengruppe, die ein erhöhtes Risiko trägt an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung zu erkranken, signifikant höher als in der Allgemeinbevölkerung (55). Somit könnten GAB Ausdruck einer genetischen Disposition für Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn sein.

Trotz fehlendem Nachweis erhöhter Titer von Autoantikörpern gegen die intestinale Isoform von Tropomyosin in einer Studie an Patienten mit Colitis ulcerosa (85) belegt eine neuere Studie, dass der prozentuale Anteil IgG produzierender Plasmazellen in der Schleimhaut von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen signifikant höher ist als bei Gesunden und dass in Patienten mit Colitis ulcerosa bis zu 75% dieser Plasmazellen Autoantikörper produzieren, die gegen die intestinale Isoform von Tropomyosin gerichtet sind (118). Die klinische Bedeutung bedarf noch der Klärung.

Obwohl neben genannten auch noch weitere Autoantikörper bei Patienten mit Colitis ulcerosa zu finden sind, steht bis heute der Beweis aus, dass diese einen destruktiven entzündlichen Prozess in Gang setzen können, im Sinne einer Autoantikörper-abhängigen cytotoxischen Reaktion (121).

Das gleichzeitige Auftreten von Autoimmunphänomenen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen muss demnach nicht auf einer ursächlichen Beziehung beruhen. Das Vorkommen von Autoantikörpern könnte auf eine polyklonale Aktivierung bei bestehender Regulationsstörung des Immunsystems zurückzuführen sein bzw. Ausdruck einer genetischen Disposition sein.

### 1.3.3. Infektiöse Genese

Durch die klinische Ähnlichkeit der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit infektiösen gastrointestinalen Erkrankungen wurde eine mögliche infektiöse Ursache bis in die jüngste Vergangenheit immer wieder postuliert.

Schübe von Colitis ulcerosa können mit der Shigellen- oder Amöbenruhr oder Infektionen mit *Campylobacter* spp. verwechselt werden. Akute Schübe von Morbus Crohn ähneln nicht nur in der Symptomatik, sondern auch in der Histopathologie, Infektionen mit *Mykobacterium tuberculosis* oder *Yersinia enterocolitica*.

Ähnlichkeiten des Morbus Crohn bestehen auch mit der "Johne´s disease", eine durch *Mykobacterium paratuberculosis* verursachte chronisch granulomatöse Enteritis bei Wiederkäuern. In mehreren Studien konnte *Mykobacterium paratuberculosis* aus Proben von Patienten mit Morbus Crohn isoliert werden, jedoch ist das Vorkommen nicht spezifisch für Morbus Crohn (69). Widersprüchliche Daten zum Nachweis von *Mykobacterium paratuberculosis* mittels PCR sind publiziert. Einige Studien postulieren positive Ergebnisse bei bis zu 40% der Biopsien von Patienten mit Morbus Crohn (44), andere Untersuchungen, die sich der gleichen Methodik des Nachweises bedienen, verneinen positive Ergebnisse ganz (82).

Die klinischen Studien zur Wirksamkeit einer antimykobakteriellen Therapie sind insofern schwer zu interpretieren, als keine Antibiotikatherapie existiert, die spezifisch gegen *Mykobacterium paratuberculosis* wirkt, sondern immer auch gegen die physiologische Darmflora. Weitere Mängel liegen in der niedrigen Probandenzahl und einem fehlenden Nachweis der Elimination von *Mykobacterium paratuberculosis* nach abgeschlossener Therapie (144).

Epidemiologisch konnte in Schweden ein Zusammenhang zwischen intrauteriner und perinataler Maserninfektion und späterer Erkrankung an Morbus Crohn hergestellt werden (41, 43). Weiterhin konnten im Gefäßendothel von Patienten mit Morbus Crohn Paramyxovirus – ähnliche Strukturen im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Nach Meinung der Autoren unterstützt dies die Hypothese, dass beim Morbus Crohn ein vaskulitisches Geschehen durch eine Persistenz von Masernviren eine Rolle spielen könnte. In situ Hybridisierungstechniken und immunhistochemische

Anfärbung scheinen das Vorkommen von Masernviren im Gefäßendothel zu bestätigen (171). In einer unabhängigen Studie waren Masernviren durch immunhistochemische Anfärbung in Schleimhautproben des Kolons von Patienten mit Morbus Crohn nachzuweisen, jedoch waren vergleichbare Ergebnisse auch bei Proben von Patienten mit Colitis ulcerosa und Kolitiden anderer Genese zu erzielen (75). Das Vorkommen von Masernvirusgenom in Schleimhautbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnte durch sehr sensitive und spezifische PCR Methoden allerdings nicht bestätigt werden (53, 64).

Gegen eine Verursachung des Morbus Crohn durch eine persistierende Maserninfektion spricht auch, dass die Antikörpertiter gegen Masern im Serum von Patienten mit Morbus Crohn im Vergleich zu Gesunden nicht erhöht sind (48). Eine Untersuchung der Literatur anhand der Bradford-Hill Kriterien zur Kausalität von Maserninfektion und Morbus Crohn kommt zu dem Schluss, dass ein ursächlicher Zusammenhang sehr unwahrscheinlich ist (135).

Möglicherweise erhöht sich das Risiko an Colitis ulcerosa oder an Morbus Crohn zu erkranken, wenn in der Kindheit eine Infektion mit Masern und Mumps im gleichen Jahr erfolgte (108). Der Nachweis von Mumps Virus RNA in Darmschleimhautbiopsien von an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen betroffenen Patienten gelang jedoch nicht (51). Dies spricht gegen ein Verursachung der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch Persistenz des Mumpsvirus.

Weiterhin wurden verschiedene *Helicobacter species* und *Escherichia coli* Stämme als mögliche infektiöse Erreger bei Colitis ulcerosa und Morbus Crohn untersucht (144). Trotz vermehrtem Nachweis bestimmter Bakterien bei Erkrankten im Vergleich zu Gesunden, ist der kausale Zusammenhang des vermehrten Vorkommens und einer Verursachung des chronisch entzündlichen Prozesses nicht überzeugend belegt.

Bisher steht der eindeutige Nachweis einer infektiösen Genese, im klassischen Sinne, von Colitis ulcerosa und Morbus Crohn aus. Die klinische und histopathologische Ähnlichkeit mit bekannten infektiösen gastrointestinalen Erkrankungen ließe sich auch dadurch erklären, dass das mukosale

Immunsystem in der Vielfalt der Reaktionsweisen beschränkt ist und Entzündungsreaktionen ausgelöst durch unterschiedliche Trigger sich demnach klinisch und histopathologisch ähneln.

#### **1.3.4. Immunregulationsstörung gegenüber luminalen Antigenen**

Die bisher favorisierte These zur Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen geht von einer gestörten immunologischen Antwort auf Bestandteile der physiologischen Darmflora in einem genetisch prädisponierten Individuum aus. Zahlreiche klinische und experimentelle Studien stützen diese Hypothese.

Die chronische Natur beider Erkrankungen und der spontan rezidivierende Verlauf lässt ein endogenes Antigen vermuten, das das Immunsystem permanent aktiviert und somit eine entzündliche Reaktion in Gang setzt.

Da das entzündliche Geschehen bevorzugt in Darmabschnitten mit hohen bakteriellen Konzentrationen stattfindet, ist die physiologische Darmflora als Antigenquelle naheliegend (144). Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass eine Therapie mit Antibiotika zur Remission in akuten Schüben von Morbus Crohn führt (33) und insbesondere in der Behandlung von perianalen Fisteln die Therapie mit Metronidazol wirksam ist (92).

Weiterhin kann durch operative Ausschaltung betroffener Darmabschnitte von der Stuhlpassage eine Remission erzielt und die Abheilung von Fisteln beobachtet werden. Die Wiederherstellung der Stuhlpassage ist oft von einem Rezidiv begleitet (175). Im Gegensatz dazu kann bei der Colitis ulcerosa durch die alleinige Anlage eines Ileostomas keine Abheilung im belassenen Kolon herbeigeführt werden. Auch der Einsatz von Antibiotika bei akuten Schüben und in der Erhaltungstherapie bleibt bei der Colitis ulcerosa umstritten (94).

Die Mucinschicht, die die Darmepithelien überzieht, gilt als wichtige Schutzbarriere gegenüber Antigenen aus dem Darmlumen. In Schleimhautbiopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist im Vergleich zu Kontrollen eine vermehrte Ansammlung verschiedener Bakterien der Darmflora in der Mucinschicht zu erkennen, die einen engeren Kontakt der

Epithelzellen mit bakteriellen Antigenen ermöglicht (149). Eine neuere Untersuchung weist bei Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine Schicht fäkaler Bakterien nach, die der Darmschleimhaut anhaftet und die bei gesunden Kontrollen fehlt. Des Weiteren fand sich bei diesen Patienten in nicht entzündlich veränderten Darmabschnitten eine höhere Konzentration an anhaftenden Bakterien als in entzündlich veränderten Darmabschnitten (160). Dies untermauert die These, dass Bakterien der Darmflora bzw. ihre Produkte nicht direkt verantwortlich sind für die entzündlichen Läsionen der Schleimhaut, ihnen jedoch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zukommt.

Eine weitere Störung der Barrierefunktion besteht in der messbar erhöhten intestinalen Permeabilität bei Patienten mit Morbus Crohn, vor allem gegenüber hochmolekularen Komponenten (117). Eine neuere *in vitro* Studie bestätigt die intestinale Permeabilitätsstörung nicht nur in entzündlich veränderten Bereichen, sondern auch in nichtentzündlichen Abschnitten (156).

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war in mehreren Studien eine Störung der epithelialen interzellulären Barriere festzustellen, die sich in einer deutlichen Minderung des epithelialen Widerstandes quantifizieren lässt (159).

Die vermehrte Aufnahme von bakteriellen und anderen Antigenen aus dem Darmlumen ist dadurch erleichtert bzw. erst möglich. Für eine tatsächlich vermehrte Aufnahme spricht, dass Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen erhöhte Titer von Antikörpern gegen eine Vielzahl verschiedener Darmbakterien aufweisen (144).

Aussagekräftige Hinweise zur Rolle der physiologischen Darmflora in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten durch tierexperimentelle Studien gewonnen werden.

Verschiedene Modelle sind in der Literatur etabliert: erstens kann durch Zufuhr einer äußeren Noxe eine entzündliche Reaktion induziert werden, wie z.B. durch Dextran-Natriumsulphat im „DSS Kolitis Modell“, zweitens finden transgene oder „knock-out Tiere“ Verwendung, bei denen durch gezielte genetische Manipulation eine immunologische Veränderung induziert wird und drittens wird durch Transfer bestimmter Zellgruppen, insbesondere immunkompetente Zellen, im Empfänger eine entzündliche Darmerkrankung hervorgerufen. Allen gemeinsam ist, dass die Tiere keine entzündlichen

Schleimhautveränderungen entwickeln, wenn sie in steriler Umgebung gehalten werden, und dass eine Besserung durch Antibiotikatherapie erzielt werden kann (18).

Jedoch scheint manchen Bakterienarten dabei auch eine protektive Rolle zuzukommen. Mäusen, denen beide Allele des IL-10 Gens fehlen (sog. IL-10<sup>-/-</sup> Mäuse), ein wesentliches antiinflammatorisches Zytokin, entwickeln bei Besiedelung mit normaler Darmflora eine spontane Enterocolitis (151). Durch Gabe von *Lactobacillus species*, eines Probiotikum, kann die Entwicklung der Colitis verhindert werden (100). Erste Studien zur Wirksamkeit von Probiotika in der Therapie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen konnten positive Effekte, vor allem in der Behandlung der Pouchitis und möglicherweise der Colitis ulcerosa verzeichnen (59).

Bakterien, insbesondere bestimmte bakterielle Moleküle wie z.B. Lipopolysaccharide, sind potente Auslöser einer Entzündung. Sie rufen in Gesunden trotz physiologischem Vorkommen in der Darmflora keine entzündlichen Veränderungen der gastrointestinalen Schleimhäute hervor. Dagegen scheint in Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine gestörte Immuntoleranz bzw. Immunantwort gegenüber diesen Antigenen die Entzündungsreaktion mit nachfolgender Schleimhautschädigung zu induzieren bzw. zu perpetuieren.

Den T-Lymphozyten, vor allem der Subgruppe der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, kommt dabei eine zentrale Rolle zu, ebenso wie den von ihnen produzierten Zytokinen.

Der Morbus Crohn ist durch eine vermehrte Anzahl aktivierter T-Lymphozyten in der intestinalen Schleimhaut und durch vermehrte Produktion proinflammatorischer Zytokine, z.B. IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$ , gekennzeichnet (98). In tierexperimentellen Modellen entzündlicher Schleimhautschädigung kann durch die Gabe von anti-CD 4-Antikörpern, die direkt die CD 4<sup>+</sup> T-Lymphozyten inhibieren, die entzündliche Reaktion verhindert werden (18).

CD 4<sup>+</sup> T-Lymphozyten der Lamina propria von Patienten mit Morbus Crohn zeigen ein Th1 differenziertes Zytokinsekretionsmuster mit signifikant erhöhter IFN- $\gamma$  Sekretion gegenüber Kontrollen und erniedrigter Sekretion von IL-4 und IL-5. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa ist dagegen eher ein Th2 differenziertes Sekretionsmuster mit stark erhöhter Produktion von IL-5, jedoch nicht IL-4, erkennbar im Vergleich zu Kontrollen (56). Die These, dass den entzündlichen Veränderungen beim

Morbus Crohn eine exzessive Produktion von Th1 Zytokinen zugrunde liegt, während bei der Colitis ulcerosa eine vermehrte Produktion von Th2 Zytokinen im Vordergrund steht, wird durch Beobachtungen an experimentellen Modellen gestützt. Während durch Th1 Antworten hervorgerufene entzündliche Reaktionen transmural und granulomatös sind, zeichnen sich durch Th2 Differenzierung gekennzeichnete Erkrankungen durch eine ödematöse, exsudative Entzündung der oberflächlichen Schichten aus (18).

Eine weitere wichtige Quelle der Zytokinproduktion stellen Makrophagen dar, die aus der Blutbahn in die Darmschleimhaut einwandern (139).

Als Antwort auf bakterielle oder parasitäre Reize produzieren Makrophagen IL-12, das T-Zellfunktionen steuert und eine Th1 differenzierte Zytokinausschüttung induziert (105). Monozyten und Makrophagen der Lamina propria aus entzündlich veränderten und nicht-veränderten Schleimhautbezirken von Patienten mit Morbus Crohn exprimieren und setzen spontan IL-12 frei, was bei Kontrollen und Patienten mit Colitis ulcerosa nicht der Fall ist (106). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von T-Zellen mit IL-12 in Explantaten fetalen Darms in der Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$  resultiert und eine Schleimhautschädigung bewirkt (196). Die zentrale Rolle von IL-12 wurde auch durch tierexperimentelle Studien belegt. In mehreren Modellen konnte durch Gabe von anti-IL-12 die Entstehung einer Colitis verhindert bzw. eine bereits bestehende Colitis erfolgreich behandelt werden (18).

Die meisten der proinflammatorischen Cytokine werden durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in ihrer Expression reguliert. Bei Patienten mit Morbus Crohn wurden in Kolonbiopsien nicht nur erhöhte Cytokinwerte gemessen, sondern auch erhöhte Werte von NF- $\kappa$ B in der Lamina propria im Vergleich zu Kontrollen (148). Auch Patienten mit Colitis ulcerosa exprimieren vermehrt NF- $\kappa$ B, jedoch in geringerem Maße als Patienten mit Morbus Crohn (148).

Die zentrale Rolle von NF- $\kappa$ B in der Pathogenese des Morbus Crohn wird unter anderem auch dadurch deutlich, dass die etablierte Therapie mit 5-ASA Präparaten und Glucocorticoiden nachweislich NF- $\kappa$ B in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor hemmt (11, 170).

Bei Gesunden wird die Antigen abhängige T-Zellaktivierung durch mehrere Mechanismen gegenreguliert, unter anderem durch Apoptose aktivierter T-Zellen und Produktion antiinflammatorischer Zytokine, z.B. IL-10, TGF- $\beta$ , um so die entzündliche Reaktion einzudämmen (98). Die T-Lymphozyten der Lamina propria von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zeigen neben einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine auch eine verminderte Sensitivität gegenüber bestimmten zur Apoptose führenden Reizen (19). Dies erklärt unter anderem den unkontrollierten Zustand der T-Zellaktivierung.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durch eine überschießende Immunantwort des mukosalen Immunsystems charakterisiert sind.

Beim Morbus Crohn ist eine Th1 differenzierte T-Zellantwort erkennbar mit erhöhter Produktion von IL-12, IFN- $\gamma$  und TNF $\alpha$ . Vieles deutet darauf hin, dass die Immunantwort gegen Bestandteile der physiologischen Darmflora gerichtet ist. Tierexperimentelle Modelle belegen, dass eine durch bakterielle Bestandteile der Darmflora hervorgerufene T-Zellaktivierung zur entzündlichen Darmerkrankung führen kann.

Die Colitis ulcerosa zeigt eher eine Th2 differenzierte T-Zellantwort, jedoch ist die Rolle der T-Zellaktivierung und die exzessive Zytokinproduktion neben den vorkommenden Autoimmunmechanismen im Hinblick auf die Pathogenese noch nicht geklärt.

### **1.3.5. Äußere Einflüsse**

Die Konkordanzraten für chronisch entzündliche Darmerkrankungen bei monozygoten Zwillingen liegen unter 100% (167) und machen damit deutlich, dass neben einer genetischen Prädisposition auch Umwelteinflüsse zur Pathogenese beitragen.

Insbesondere das Zigarettenrauchen und der Verzehr verschiedener Nahrungsbestandteile waren Gegenstand zahlreicher Untersuchungen.

Patienten mit Morbus Crohn rauchen häufiger als vergleichbare Kontrollen, und die Assoziation ist am stärksten bei Krankheitsbeginn. Dagegen rauchen Patienten mit Colitis ulcerosa seltener als

vergleichbare Kontrollen und 76% gaben an vor Krankheitsbeginn mit dem Rauchen aufgehört zu haben (164). Während Rauchen das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken verdoppelt, erkranken aktive Raucher seltener an Colitis ulcerosa als Nichtraucher (93). Eine Meta-Analyse mehrerer Studien zum Einfluss von Rauchen auf chronisch entzündliche Darmerkrankungen bestätigt das erhöhte Risiko für Morbus Crohn unter Rauchern und den protektiven Effekt des Rauchens auf die Entwicklung von Colitis ulcerosa (26).

Bestimmte Nahrungsmittel können bei einzelnen Patienten mit Morbus Crohn Beschwerden hervorrufen. Auslassdiäten haben sich in einigen Fällen als wirksam erwiesen, aber es konnte nicht bestätigt werden, dass mit Wiederaufnahme beschuldigter Nahrungsmittel in den Speiseplan ein Rezidiv provoziert werden kann (25).

In mehreren retrospektiven Studien wurde ein Zusammenhang zwischen vermehrter Zuckeraufnahme und Morbus Crohn propagiert, jedoch besteht keine Korrelation zwischen der Prävalenz von Morbus Crohn und dem pro Kopf Zuckerkonsum (91).

Kürzlich konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Colitis ulcerosa errechnet werden bei vermehrter Aufnahme einfach und mehrfach ungesättigter Fettsäuren und Vitamin B6 (58).

Sicher ist, dass äußere Faktoren zur Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen. Welche Faktoren im Einzelnen beteiligt sind, bedarf noch der Klärung.

## 1.4. Positionelle und funktionelle Kandidatengene

Ein Ansatz zur Identifizierung möglicher Gene oder Genabschnitte, die in der Ätiologie oder in der Pathogenese einer Erkrankung eine Rolle spielen, ist die Durchführung von Kopplungsanalysen. Als positionelle Kandidatengene werden Gene bezeichnet, die innerhalb dieser identifizierten Kopplungsregion liegen.

Ein weiterer Ansatz beruht auf der Untersuchung von funktionellen Kandidatengenen. Den Genprodukten dieser bekannten Gene kann eine Rolle in der Entstehung oder im Verlauf der Erkrankung aus pathogenetischen Überlegungen zugeschrieben werden. Werden bestimmte Allele oder Mutationen in diesen Genen bei Erkrankten signifikant häufiger nachgewiesen als bei Gesunden, weist dies auf einen pathogenetischen Zusammenhang hin.

Im folgenden werden die Kandidatengene epidermal growth factor Rezeptor (EGFR), Motilin und NOD2/CARD 15 vorgestellt, die sowohl positionelle als auch funktionelle Kandidatengene sind.

### 1.4.1. EGFR

Der menschliche epidermal growth factor Rezeptor (EGFR) liegt auf Chromosom 7 (37), innerhalb der 1996 beschriebenen Kopplungsregion für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (146) und stellt demnach ein näher zu untersuchendes positionelles Kandidatengen dar.

EGFR ist ein 170 kD Glykoprotein mit einer extrazellulären Bindungsstelle, einer transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Domäne (99).

Neben epidermal growth factor (EGF) binden auch transforming growth factor ( $TGF\alpha$ ), amphiregulin, betacellulin und heparin-binding EGF-like growth factor an EGFR (103). EGF und  $TGF\alpha$  binden mit vergleichbarer Affinität an den Rezeptor (89).

Die Wirkung von EGF nach Bindung an seinen Rezeptor besteht in einer Wachstumsstimulation und Zelltransformation. Die Signaltransduktion erfolgt durch Autophosphorylation an Tyrosinresten der intrazellulären Domäne von EGFR und Phosphorylation von weiteren intrazellulären Signalmolekülen (99, 131). Mehrere Signalwege sind an der Übermittlung der Wirkung beteiligt, unter anderem der Ras-Signalweg (61). Erhöhte mRNA Spiegel der Protooncogene *myc*, *fos* und *jun* können nach EGFR Aktivierung festgestellt werden (109). EGF ist auch in der Lage durch Bindung an seinen Rezeptor den mRNA Spiegel von EGFR zu erhöhen (27).

EGFR kommt nicht nur eine zentrale Rolle im Zellwachstum und in der Zelldifferenzierung zu (174), sondern auch in der Wundheilung. An Magenschleimhaut konnte gezeigt werden, dass im Bereich des Ulcusrandes lokal Wachstumsfaktoren, insbesondere EGF, produziert werden und nach Bindung an EGFR die Migration von Epithelzellen und deren Proliferation fördern (161). Weiterhin scheint EGF die Wundheilung durch Hemmung vorhandener Apoptosemechanismen zu unterstützen (87). In seiner physiologischen Bedeutung als ubiquitär vorkommender Rezeptor für Wachstumsfaktoren und deren biologischer Aktivität bei Vorgängen des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, der Apoptose und damit der Wundheilung könnte EGFR eine Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zukommen.

EGFR liegt in mehreren verschiedenen Allelen vor (110, 124). Allel 2 unterscheidet sich von Allel 1 durch einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin im Nukleotid 1749, der einen Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin im Codon 497 bewirkt (110).

Der durch Allel 2 kodierte EGFR (HER497K) weist Unterschiede im Bindungsverhalten und in der biologischen Aktivität im Vergleich zu EGFR, der durch Allel 1 kodiert ist (HER497R). In Versuchen mit chinesischen Hamsteroarialzellen, die entweder HER497K oder HER497R exprimierten, war ein Unterschied in der Bindungsaffinität gegenüber  $TGF\alpha$  zwischen den Rezeptorvarianten nachweisbar. Weiterhin zeigten die Zellen, die HER 497K exprimierten, ein stark reduziertes Wachstum und nach Bindung von EGF und  $TGF\alpha$  im Vergleich zu HER497R exprimierenden Zellen niedrigere mRNA Level von *c-myc*, *c-fos* und *c-jun* (109).

Ohne zwischen den Rezeptorvarianten zu differenzieren, war bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine reduzierte Expression von EGFR mRNA in der Kolonschleimhaut nachweisbar im Vergleich zu Patienten mit Divertikulitis oder sporadischem Kolonkarzinom. Jedoch wurden erhöhte EGFR mRNA Level bei Patienten mit Colitis assoziierten Karzinomen nachgewiesen (6). Inwieweit EGFR als Rezeptor für Wachstumsfaktoren in der Entstehung von Kolonkarzinomen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine Rolle spielt bleibt abzuwarten.

Ein weiterer Hinweis für EGFR als funktionelles Kandidatengen ergab sich durch tierexperimentelle Studien.

In einem Experiment wurde durch Gabe von 2,4,6-Trinitrobenzoeschwefelsäure/Ethanol bei Ratten eine Kolitis induziert. Bei intraperitonealer Gabe von EGF, vor der Kolitis Induktion, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Schleimhautschäden und der entzündlichen Reaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei EGF Gabe, nach Induktion der Kolitis, wurde kein Unterschied bezüglich der Schleimhautschädigung und Entzündungsreaktion im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen (125). Die protektive Wirkung von EGF konnte nur bei systemischer Gabe von EGF nachgewiesen werden, jedoch nicht bei topischer Applikation (96).

Für die Kombinationstherapie von oralem Mesalazin und Einläufen mit EGF wurden bei Patienten mit linksseitiger Colitis ulcerosa bzw. Proktitis eine höhere Rate an Remissionsinduktion und Verringerung der Krankheitsaktivität im Vergleich zu alleiniger Therapie mit Mesalazin verzeichnet (153). Die therapeutische Anwendung von EGF muss jedoch vor dem Hintergrund des möglicherweise fördernden Potentials von EGF auf das Tumorwachstum sehr kritisch betrachtet werden.

EGFR ist somit ein positionelles und funktionelles Kandidatengen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen.

### 1.4.2. Motilin

Motilin ist ein aus 22 Aminosäuren bestehendes gastrointestinales Peptidhormon (24). Das Motilin Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert (179) eng benachbart dem HLA DQ alpha Locus (57).

Durch Sequenzierung konnten drei Polymorphismen in der Gensequenz festgestellt werden. Nur einer dieser Polymorphismen, ein Basenaustausch von Thymin zu Cytosin im Nukleotid 115, bewirkt einen Aminosäureaustausch von Valin zu Alanin im Motilin (57).

Im weiteren wird mit Allel 1 die Sequenz bezeichnet, die Thymin an Stelle 115 aufweist und mit Allel 2 die Sequenz, die Cytosin an Stelle 115 aufweist.

Motilin wird von runden, enterochromaffinen, nicht-argentaaffinen endokrinen Zellen sezerniert, die vor allem in der Schleimhaut im oberen Abschnitt des Dünndarms zu finden sind (81).

Der adäquate Reiz zur Sekretion von Motilin ist ein Absinken des pH Wertes im Duodenum (168).

Die physiologische Rolle von Motilin besteht in der Regulation der interdigestiven Motilitätsmuster. Motilinserumspiegel zeigen zyklische Veränderungen während der interdigestiven Phase, wobei die Konzentrationsspitzen mit Ende der Phase II und Beginn der Phase III des interdigestiven Motorkomplex zusammenfallen (180). Als myoelektrischer Motorkomplex werden Zyklen mit verschiedenen Phasen rhythmischer Kontraktionen bezeichnet, die ihren Ursprung im Antrum bzw. im oberen Duodenum nehmen und sich aboral fortpflanzen. Ihr Auftreten ist auf die interdigestiven Perioden beschränkt.

Die Zufuhr von synthetischem Motilin per infusionem induziert ein Phase III Kontraktionsmuster im Antrum, das sich aboral ausbreitet (81).

Nach Nahrungsaufnahme kommt es zur Unterbrechung des myoelektrischen Motorkomplexes und zur Inhibition der Motilinausschüttung, wobei sich die Dauer an der Zusammensetzung der Nahrung ausrichtet (129).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Motilin die Sekretion von Wachstumshormon stimuliert (142) und sowohl in Mäusen, als auch in Ratten zu einer Steigerung der Nahrungsaufnahme führt (10, 138).

Seine Wirkung entfaltet Motilin über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, dessen Expression vorwiegend im Duodenum, Jejunum und Kolon nachzuweisen ist und der eine 52%ige Sequenzhomologie zum Wachstumshormonrezeptor aufweist (45).

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weisen Auffälligkeiten ihrer gastrointestinalen Motilität auf. Aufgrund der physiologischen koordinativen Rolle von Motilin ist dieses gastrointestinale Peptid ins Blickfeld mehrerer Untersuchungen geraten.

Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn weisen erhöhte basale und postprandiale Serumspiegel von Motilin auf im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen (16).

Erhöhte Motilin Serumspiegel sind auch dann noch nachzuweisen, wenn der erkrankte Darmabschnitt durch Kolektomie bei Patienten mit Colitis ulcerosa entfernt wurde (63).

Patienten mit Colitis ulcerosa leiden des weiteren unter einer verminderten postprandialen Kontraktibilität des Kolons und in der Amplitude vermindert, aber in der Frequenz vermehrter propulsiver Peristaltik (128).

Obwohl in Remission, zeigen Patienten mit Morbus Crohn gestörte Motilitätsmuster mit erhöhter Inzidenz von propulsiven Kontraktionen und postprandialer Hypomotilität im Antrum. Am stärksten von diesen Veränderungen betroffen sind Patienten mit Befall des terminalen Ileums (7).

Im 2,4,6-Trinitrobenzoeschwefelsäure Kolitis Modell des Hasen zeigte sich eine reduzierte Kolonkontraktibilität in entzündlich veränderten Kolonabschnitten durch eine Herabregulation der

Motilinrezeptoren, bei unveränderten Motilinserumspiegeln und Motilingehalt der Kolonschleimhaut. Gleichzeitig konnte eine vermehrte Expression der Motilinrezeptoren im nicht entzündlich veränderten Antrum nachgewiesen werden (38).

Inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind, bleibt abzuwarten, jedoch weisen sie möglicherweise auf eine Beteiligung von Motilin in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin.

### **1.4.3. NOD2/CARD 15**

Das NOD2 Gen (auch als CARD 15 bezeichnet) ist in der perizentromerischen Region auf Chromosom 16 lokalisiert (73) innerhalb der bereits 1996 als IBD1 bezeichneten Kopplungsregion für Morbus Crohn (74). IBD1 wurde durch mehrfache Kopplungsanalysen bestätigt (8, 28) und NOD2 wurde als für Morbus Crohn prädisponierendes Gen identifiziert (65, 73, 114).

NOD2 gehört zur Familie der Proteine mit nucleotide-binding oligomerization domains, deren Funktion in der Regulation des programmierten Zelltodes und der Regulation von Immunantworten besteht (76).

Das 1040 Aminosäuregerüst (114) von NOD2 gliedert sich in folgende funktionelle Domänen. Das N-terminale Ende setzt sich aus zwei CARD (caspase recruitment domain) Domänen zusammen, die über eine zentral gelegene NBD (nucleotide-binding domain) Domäne mit den repetitiven leucinreichen Sequenzen, sog. Leucine-rich repeats (LRRs), am C-terminalen Ende in Verbindung stehen (115).

NOD2 ist ein cytosolischer Rezeptor, der über seine LRR-Domäne Lipopolysaccharidbestandteile und Peptidoglykanbestandteile bakterieller Zellwände erkennt und via Rick zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (77). NF- $\kappa$ B unterliegt als Transkriptionsfaktor die Regulation verschiedenster Gene, insbesondere Gene proinflammatorischer Zytokine (29).

Die Expression von NOD2 beschränkt sich nicht wie ursprünglich postuliert auf Monozyten des peripheren Blutes (115), sondern NOD2 wird auch in dendritischen Zellen, Darmepithelien und Paneth'schen Zellen exprimiert (15, 72, 88).

Mehrere Mutationen im NOD2 Gen sind mit Morbus Crohn assoziiert, wobei die häufigste Mutation eine Cytosin Insertion im Nukleotid 3020 (3020insC) ist (114). Durch die Rasterverschiebung kommt es zu einem frühzeitigen Translationsstopp und demnach zu einem auf 1007 Aminosäuren verkürzten NOD2 Protein (114). Die funktionelle Relevanz dieser Insertions-Mutation konnte durch *in vitro* Untersuchungen mit dem verkürzten Protein nachgewiesen werden. Menschliche embryonale Nierenzellen, die 3020insC NOD2 exprimierten, zeigten auf Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden eine deutlich verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung im Vergleich zu Zellen, die das Wildtyp NOD2 Protein exprimierten (114).

NOD2 stellt durch seine Lage ein positionelles Kandidatengen dar. In der Rolle der Vermittlung bakterieller Stimuli und der Regulation proinflammatorischer Gene erweist es sich auch als funktionelles Kandidatengen.

## 1.5. Zielsetzung

- 1) In der vorliegenden Studie sollten Allelfrequenzen bekannter Polymorphismen bzw. Mutationen in ausgewählten Genen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen bestimmt und mit denen bei Gesunden verglichen werden. Folgende Polymorphismen bzw. Mutationen in funktionellen oder positionellen Kandidatengenen werden untersucht:
  - G/A Polymorphismus im Nukleotid 1749 des EGFR Gens
  - T/C Polymorphismus im Nukleotid 115 des Motilin Gens
  - C-insertion im Nukleotid 3020 des NOD2 Gens
- 2) Die genannten Genvarianten sollten auf eine Assoziation mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn überprüft werden.
- 3) Weiterhin sollte untersucht werden, ob bestimmte klinische Phänotypen der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit genannten Genvarianten assoziiert sind.
- 4) Es sollte überprüft werden, ob das Vorkommen von p-ANCA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen mit untersuchten Genvarianten korreliert.

## **2. Patienten und Methoden**

### **2.1. Studienpopulation**

Die Studienpopulation setzte sich aus zwei unterschiedlich rekrutierten Gruppen zusammen. Im klinikeigenen EDV-System wurden anhand der ICD-Nummern alle Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa identifiziert, die sich zwischen 1986 bis 1996 in ambulanter oder stationärer Betreuung befanden. Diesen Patienten wurden schriftlich Inhalt und Zielsetzung der geplanten Studie mitgeteilt und sie um eine einmalige Blutentnahme von 30ml gebeten. Die Blutentnahme erfolgte nach schriftlicher Einverständniserklärung.

Patienten mit Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa, die sich von 1997 bis 2001 in ambulanter oder stationärer Betreuung befanden und noch nicht in die Studie aufgenommen worden waren, wurde in einem Gespräch der Hintergrund der geplanten Studie erläutert. Nach mündlicher und anschließend schriftlicher Einverständniserklärung erfolgte die einmalige Blutentnahme von 20ml.

Nach der Blutentnahme wurden die Proben mit einem Zifferncode versehen, der Patientennamen und -daten verschlüsselte.

Als Kontrollpopulation dienten 120 gesunde, unverwandte Blutspender.

Insgesamt wurden DNA Proben von 103 Patienten mit Morbus Crohn, 100 Patienten mit Colitis ulcerosa und 120 gesunde Kontrollpersonen untersucht.

Voraussetzung zur Teilnahme an der Untersuchung war eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung. Ebenso vorausgesetzt wurde eine eindeutige Zuordnung zum Krankheitsbild des Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa, dass heißt Fälle mit einer unklassifizierten Colitis wurden nicht berücksichtigt.

Die Krankenakten der Patienten mit Morbus Crohn wurden zusätzlich hinsichtlich des Befallsmusters der einzelnen Darmabschnitte, stattgehabter Ileozökalresektionen und des Vorkommens von Stenosen und Fisteln überprüft. Daten zum Vorkommen von p-ANCA bei den untersuchten Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wurden der Dissertationsschrift von Nicole Noehl (München) entnommen.

## **2.2. Aufarbeitung der Blutproben, Gewinnung der genomischen DNA**

Nach Entnahme von je zwei bzw. drei EDTA Röhrchen zu je 10ml Vollblut (Monovetten: Fa. Sarstedt, Nümbrecht) wurde mit den Proben wie folgt verfahren:

Die Blutröhrchen wurden für 6 Minuten bei 3600upm zentrifugiert (Zentrifuge: Fa. Hettich, Tuttlingen). Anschließend wurde das Plasma in codierte „cryotubes“ übertragen (Fa. Braun Melsungen AG, Melsungen) und der leukozytenreiche „buffy coat“ in codierte 150ml Gefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert (Pipetten: Fa. Eppendorf).

Das Plasma wurde bei -80°C und der buffy coat bei -20°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

Die genomische DNA wurde aus buffy coat mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits gewonnen (Qiagen, Hilden).

200µl buffy coat wurden mit 20µl vorgefertigter ProteinaseL und 200µl im Kit enthaltenen AL Puffer nach guter Durchmischung für 10min bei 56°C inkubiert. Nach Zusatz von 200 µl 96% Ethanol und erneutem Mischen wurde die Probe in die vorhergesehene Säule übertragen und bei 8 000upm für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in zwei Schritten mit je 500µl Waschpuffer bei 8 000upm für eine Minute bzw. 14 000upm für drei Minuten gereinigt. Im letzten Schritt wurde die gereinigte DNA durch Zentrifugation bei 8 000 upm für eine Minute mit 200µl Puffer (10mM TrisCl; 0,5 mM EDTA) aus der Säule gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -20°C tiefgefroren.

Nach dem Auftauen wurde die DNA für die weitere Verwendung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> im Verhältnis 1:100 verdünnt.

## 2.3. Typisierung der EGFR Allele

Der beschriebene Polymorphismus im EGFR Gen ist durch einen Basenaustausch von Guanin nach Adenin im Codon 497 charakterisiert, was einen Aminosäureaustausch von Lysin nach Arginin bewirkt (110). Durch den Basenaustausch geht eine Restriktionserkennungssequenz für BstN 1 verloren. Demnach besitzt Allel 1 eine Restriktionsstelle für BstN1 im Codon 497, Allel 2 jedoch nicht.

### 2.3.1. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation der genomischen DNA wurden die Primer B1 (5'-GTCTGCCATGCCTTGTGCTC-3') und B2 (5'-CTTGTCCACGCATTCCCTGC-3') verwendet (110). Sie wurden dem Reaktionsansatz in einer Endkonzentration von je 0,4  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Die Nukleotidkonzentration (dNTP) betrug 200 $\mu\text{M}$ , der Puffer setzte sich wie folgt zusammen: Tris-Cl, KCl(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,7(20°C)(Quiagen, Hilden). Q-Solution kam in einfacher Endkonzentration zur Anwendung. Die HotStarTaq Polymerase (Quiagen, Hilden) wurde dem Ansatz in einer Konzentration von 2,5 U beigemischt. Pro Reaktionsansatz wurden 25 $\mu\text{l}$  genomische DNA (1:100 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) mit 75 $\mu\text{l}$  PCR-Mix inkubiert. Der PCR-Mix setzte sich wie folgt zusammen:

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	41,7 $\mu\text{l}$
dNTP	2 $\mu\text{l}$
Puffer	10 $\mu\text{l}$
Primer B1	0,4 $\mu\text{l}$
Primer B2	0,4 $\mu\text{l}$
HotStarTaq	0,5 $\mu\text{l}$
Q-Solution	20 $\mu\text{l}$
	<hr/>
Gesamtvolumen	50 $\mu\text{l}$

Die Inkubation erfolgte bei folgenden PCR-Bedingungen:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorheizen	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	
Annealing	59°C	1 min	34
Polymerisation	72°C	1 min	
Stabilisierung	72°C	10 min	1

### 2.3.2. Restriktionsverdau

Nach der Amplifikation wurde das PCR-Produkt in einem Restriktionsverdau mit BstN 1 auf das Vorhandensein der Restriktionsstelle kontrolliert. 20µl PCR-Produkt wurden mit 0,5 U BstN 1 (NewEnglandBiolabs, Beverly, MA, USA) für 120 Minuten bei 60°C im Wärmeschrank (Fa. Labtech International, Burkhardtsdorf) inkubiert. Als Puffer wurde der mitgelieferte NEBuffer2 (50mM NaCl; 10mM Tris-HCl; 10mM MgCl; 1mM DTT; pH 7,9; 25°C) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	24,45 µl
BstN 1	0,05 µl
Puffer	5 µl
BSA	0,5 µl
	<hr/>
Gesamtvolumen	30 µl

### 2.3.3. Gelelektrophorese und Charakterisierung

Die elektrophoretische Auftrennung der Produkte des Restriktionsverdaus erfolgte in 5%igem NuSieve Gel (Fa. FMC BioProducts, USA). Homozygotie für Allel 1 zeichnete sich durch einen kompletten Verdau und demnach zwei Banden bei 48bp und 54bp aus. Bei Homozygotie für Allel 2 wurde das PCR-Produkt nicht verdaut, es resultierte eine Bande bei 102bp. Alle drei Banden waren bei Heterozygoten zu finden.(Abbildung 1) Die PCR-Produkte wurden durch Sequenzierung (Toplab, Martinsried) für zehn Proben bestätigt.

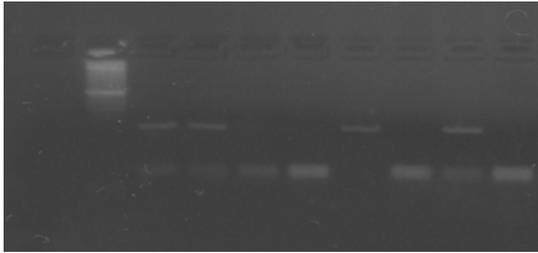


Abbildung 1:  
Auftrennung der Produkte des Restriktionsverdaus

— 102 bp ; Allel 2  
 — 54 bp ; Spaltungssprodukte von  
 — 48 bp Allel 1

## 2.4. Typisierung der Motilin Allele

Der Polymorphismus des Motilin Gens ist gekennzeichnet durch einen Basenaustausch von Thymin zu Cytosin im Exon 2, der in einem Aminosäureaustausch von Valin zu Alanin resultiert (57). Der Basenaustausch schafft eine Restriktionserkennungssequenz für PVU II. Allel 1 wird durch Fehlen dieser Erkennungssequenz nicht durch PVU II verdaut, dagegen unterliegt Allel 2 einem kompletten Verdau.

### 2.4.1. PCR-Amplifikation

Die Amplifikation der genomischen DNA erfolgte mit den Primern M1 (5'-GTCTCCACTGTACCCAAACT-3') und M2 (5'-TCATAGTGACCTCAGCCTTG-3') (179). In einem Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 60µl wurden 15µl DNA (1:100 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) inkubiert. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von je 0,5µM zugesetzt. Die Pufferzusammensetzung, die Nukleotidkonzentration und die Konzentration der HotStarTaq Polymerase entsprach dem der Untersuchung der EGFR Allele.

Folgender Reaktionsansatz wurde im Thermocycler (Fa. Biometra, Göttingen) inkubiert:

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	39,9 µl
dNTP	1,2 µl
Puffer	6 µl
Primer M1	0,3 µl
Primer M2	0,3 µl
HotStarTaq	0,3 µl
	<hr/>
Gesamtvolumen	45 µl + 15µl DNA

Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Vorheizen	95°C	15 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	
Annealing	55°C	1 min	31
Polymerisation	72°C	1 min	
Stabilisierung	72°C	10 min	1

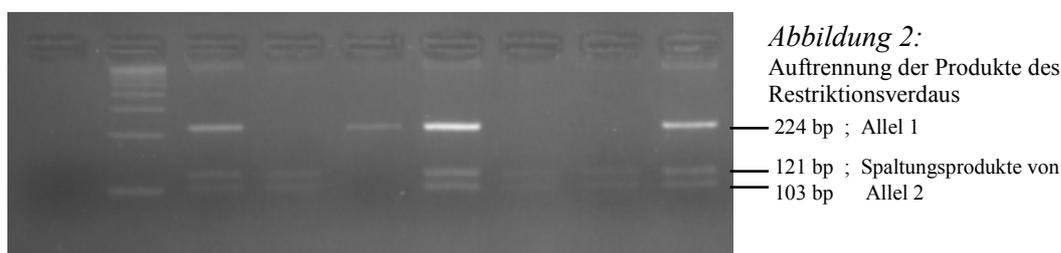
### 2.4.2. Restriktionsverdau

40µl des PCR Produkts wurden bei 37°C für 8 Stunden mit PVU II verdaut. Das Enzym PVU II wurde in einer Endkonzentration von 1 U zugesetzt. Der Puffer entsprach in seiner Zusammensetzung dem des Restriktionsverdaus mit BstN 1. Folgender Reaktionsansatz wurde im Wärmeschrank inkubiert:

H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	4,9 µl	
PVU II	0,1 µl	
Puffer	5 µl	
	10 µl	+ 40µl PCR-Produkt

### 2.4.3. Gelelektrophorese und Charakterisierung

Zur Charakterisierung wurden die Produkte des Restriktionsverdaus auf 4,5%igem NuSieve Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Lag Homozygotie für Allel 1 vor, zeigte sich eine einzelne Bande bei 224 bp. Bei Homozygotie für Allel 2 wurde das PCR-Produkt vollständig verdaut und es zeigten sich Banden bei 121 bp und 103 bp, die den Spaltprodukten entsprachen. Heterozygote wiesen alle drei Banden auf. (Abbildung 2) Die elektrophoretische Charakterisierung wurde für zehn Proben durch Sequenzierung der PCR-Produkte (Toplab, Martinsried) bestätigt.



## 2.5. Typisierung der NOD2 Allele

Die beschriebene Mutation im NOD2 Gen besteht in einer Insertion von Cytosin bei 3020bp im Exon 11. Die dadurch entstandene Rasterverschiebung führt zu einem vorzeitigen Stopp bei der Translation und somit zu einem verkürzten Protein (114).

### 2.5.1. PCR-Amplifikation

Eine Multiplex PCR wurde zum Nachweis der C-insertions Mutation eingesetzt. Mittels der Primer NOD2A (5'-CTGAGCCTTTGTTGATGAGC-3') und NOD2B (5'-TCTTCAACCACATCCCCATT-3') wurde ein die Mutationsstelle flankierendes 533 bp Stück amplifiziert. Zum Nachweis des Wildtyp bzw. des 3020insC Allels wurden die mutationspezifischen Primer NOD2w (5'-CAGAAGCCCTCCTGCAGGCCCT-3') und NOD2m (5'-CGCGTGTCATTCCTTTCATGGGGC-3') zugesetzt (114). NOD2A und NOD2B wurden in einer Endkonzentration von je 0,5 µM, NOD2w von 0,2 µM und NOD2m von 0,4 µM verwendet. Die Pufferzusammensetzung, die Nukleotidkonzentration und die Konzentration der HotStarTaq Polymerase entsprach denen der vorbeschriebenen PCR. Somit wurde folgender Reaktionsansatz mit 10 µl DNA inkubiert:

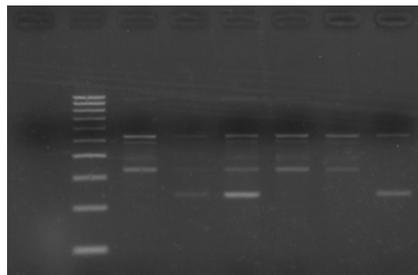
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	24,3 µl
Puffer	4 µl
dNTP	0,8 µl
Primer NOD2A	0,2 µl
Primer NOD2B	0,2 µl
Primer NOD2m	0,16 µl
Primer NOD2w	0,08 µl
HotStarTaq	0,2 µl
Gesamtvolumen	30 µl

Die Reaktionsbedingungen waren folgende:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
<b>Vorheizen</b>	95°C	15 min	1
<b>Denaturierung</b>	94°C	1 min	
<b>Annealing</b>	64°C	1 min	29
<b>Polymerisation</b>	72°C	1 min	
<b>Stabilisierung</b>	72°C	10 min	1

## 2.5.2. Gelelektrophorese und Charakterisierung

Die PCR Produkte wurden auf 2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das C-insertions Allel war durch eine Bande bei 214 bp zu erkennen, das Wildtyp Allel durch eine Bande bei 319 bp. (Abbildung 3) Die C-insertion wurde zur Etablierung der Methode durch Sequenzierung (Toplab, Martinsried) bestätigt.



*Abbildung 3:*  
Auftrennung der PCR-Produkte

— 533 bp  
— 319 bp ; Wildtyp Allel  
— 214 bp ; C-insertions Allel

## **2.6. Statistische Auswertung und verwendete Software**

Die im Ergebnisteil angeführten Daten wurden mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests und des Fisher's Exakt Test bestimmt.

Folgende Programme wurden verwendet: Word 97, Excel, SPSS for Windows.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Häufigkeitsverteilung der EGFR Allele

64% (64/100) der Patienten mit Colitis ulcerosa waren homozygot für Allel 1. Unter den 36% (36/100) Genträgern für Allel 2 waren 3% (3/100) Homozygote. Die Allelfrequenz für Allel 1 betrug 81% und für Allel 2 20%.

Die Patienten mit Morbus Crohn zeigten folgende Allel Verteilung: 53% (55/103) waren homozygot für Allel 1, 8% (8/103) homozygot für Allel 2 und demnach 39% (40/103) heterozygot.

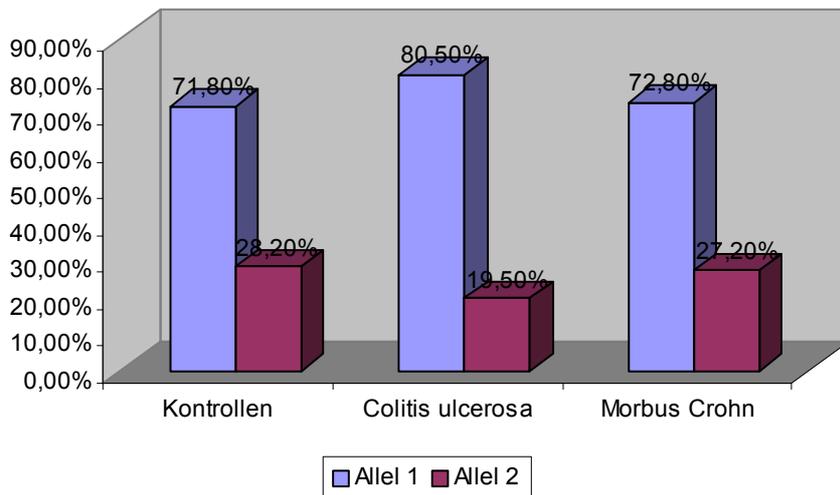
In der Kontrollpopulation betrug die Allelfrequenz für Allel 1 72%, für Allel 2 28%.

Die Allelfrequenzen der Patienten mit Colitis ulcerosa wiesen im Vergleich zur Kontrollpopulation signifikante Unterschiede auf ( $p < 0,05$ ), einzelne Genotypen waren dagegen nicht assoziiert.

Die Allelverteilung bei Patienten mit Morbus Crohn war der Verteilung in der Kontrollpopulation vergleichbar.

(Diagramm 1; Tabelle 1)

Von den 120 untersuchten Proben der Kontrollpopulation war ein Ergebnis nicht eindeutig zu ermitteln und wurde bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.



*Diagramm 1:*  
Allelfrequenzen des EGFR  
Polymorphismus

	Homozygot Allel 1	Allel 1/Allel 2	Homozygot Allel 2	Summe
<b>Kontrollen</b>	62	47	10	119
<b>Colitis ulcerosa</b>	64	33	3	100
<b>Morbus Crohn</b>	55	40	8	103

(Tabelle 1)

### 3.2. Häufigkeitsverteilung der Motilin Allele

Allel 1 war bei 17% (17/98) der Colitis ulcerosa Patienten homozygot nachweisbar. 83% (81/98) waren Träger des Allel 2, davon 33% (33/98) homozygote Träger. Die Allelfrequenz für Allel 1 betrug 42%, für Allel 2 58%.

Vergleichbar war die Verteilung der Allele unter Patienten mit Morbus Crohn, wovon 17% (17/100) homozygote Träger des Allels 1 waren und 83% (83/100) Träger des Allels 2. Homozygote Träger für Allel 2 waren mit 32% (32/100) vertreten. Bei Patienten mit Morbus Crohn wurden Allelfrequenzen von 43% für Allel 1 und 57% für Allel 2 errechnet.

Die Allelfrequenz für Allel 1 in der Kontrollpopulation war 39% und für Allel 2 61%. (Diagramm 2; Tabelle 2)

Von den 100 untersuchten Patienten mit Colitis ulcerosa waren zwei der Proben nicht eindeutig auswertbar, ebenso drei Proben von den 103 untersuchten Morbus Crohn Patienten. Sie fanden bei der statistischen Auswertung keine Berücksichtigung.

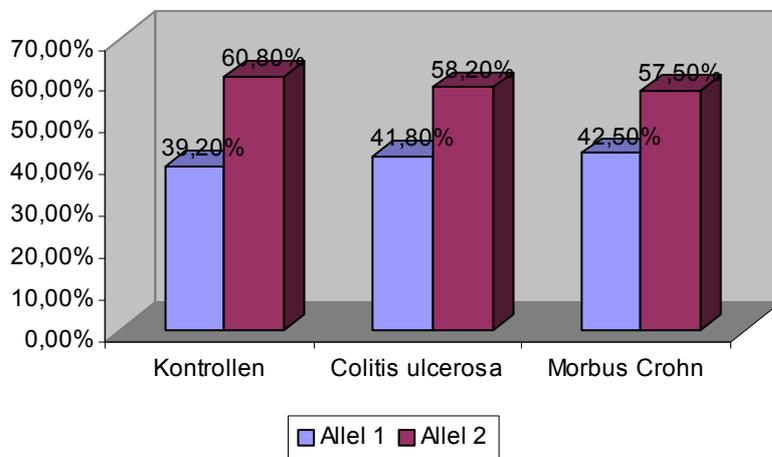


Diagramm 2:  
Allelfrequenzen des  
Motilinpolymorphismus

	Homozygot Allel 1	Allel 1/Allel 2	Homozygot Allel 2	Summe
<b>Kontrollen</b>	16	62	42	120
<b>Colitis ulcerosa</b>	17	48	33	98
<b>Morbus Crohn</b>	17	51	32	100

(Tabelle 2)

### 3.3. NOD2/CARD 15

#### 3.3.1. Frequenz der C-insertions Mutation

23% (24/103) der Patienten mit Morbus Crohn wiesen die C-insertions Mutation auf, was einer Allelfrequenz von 14% entspricht. Nur 4% (4/97) der Patienten mit Colitis ulcerosa und 3% (4/120) der Kontrollpersonen waren Träger des C-insertions Allels ( $p < 0,0001$ ). 3,9% (4/103) der Morbus Crohn Patienten waren homozygot für diese Mutation, jedoch keiner der Patienten mit Colitis ulcerosa und keine der Kontrollpersonen. (Diagramm 3;Tabelle 3)

Von den 100 untersuchten Patienten mit Colitis ulcerosa wurden drei Proben aufgrund widersprüchlicher Ergebnisse bei wiederholten Untersuchungen von der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

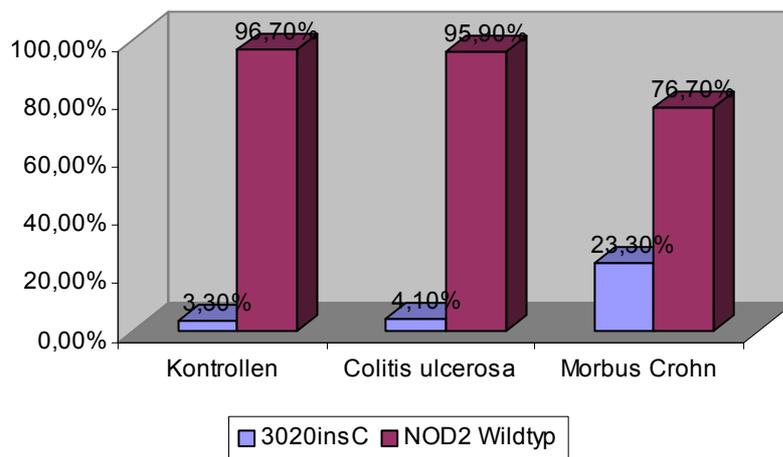


Diagramm 3:  
Häufigkeitsverteilung der 3020insC

	Homozygot NOD2	NOD2/3020insC	Homozygot 3020insC	Summe
<b>Kontrollen</b>	116	4	0	120
<b>Colitis ulcerosa</b>	93	4	0	97
<b>Morbus Crohn</b>	79	20	4	103

(Tabelle 3)

### 3.3.2. Genotyp-Phänotyp Korrelation

Entsprechend ihres klinischen Erscheinungsbildes wurden 97 Patienten mit Morbus Crohn retrospektiv nach Befallsmuster des Darmes, fibrostenotischen, fistulierenden und inflammatorischen Subtyp, sowie früheren Ileozökalresektionen bzw. Ileumteilresektionen, die durch eine rechte Hemikolektomie erweitert wurden, ausgewertet und diese Angaben mit ihrem jeweiligen Genotyp korreliert.

Eine isolierte Dünndarmbeteiligung lag bei 9% (9/97) vor, eine isolierte Dickdarmbeteiligung bei 12% (12/97) und eine kombinierte Dün- und Dickdarmbeteiligung bei 77% (75/97). C-insertions

Genträger wiesen in ihrem Befallsmuster keine signifikanten Unterschiede zu Nicht-Genträgern auf.

(Tabelle 4)

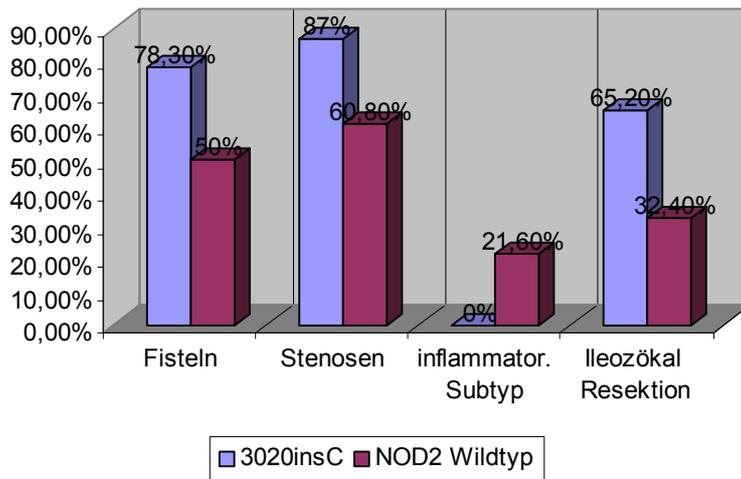
	<b>c-insertions Allel +</b>	<b>c-insertions Allel -</b>
<b>Isolierte Dünndarmbeteiligung</b>	1	8
<b>Isolierte Dickdarmbeteiligung</b>	1	11
<b>Dün- und Dickdarmbeteiligung</b>	21	55
n.s.(p= 0,223)		

*(Tabelle 4)*

78% (18/23) der C-insertions Genträger waren dem fistulierenden Subtyp zuzuordnen, verglichen mit 50% (37/74) der Nicht-Mutationsträger (p=0,029). Der stenosierende Subtyp war mit 87% (20/23) unter den C-insertions Genträgern verglichen mit 61% (45/74) unter den Nicht-Mutationsträgern signifikant gehäuft vertreten (p=0,023). 66% (15/23) der Mutationsträger wiesen gleichzeitig Stenosen und Fisteln auf.

Der inflammatorische Subtyp war negativ mit der C-insertions Mutation korreliert; unter den Nicht-Mutationsträgern wiesen 22% (16/74) den inflammatorischen Subtyp auf, jedoch keiner der C-insertions Mutationsträger ließ sich diesem Erscheinungsbild zuordnen (p=0,011).

40% (39/97) der Patienten hatten sich einer Ileozökalresektion unterzogen. Bei Korrelation entsprechend des Genotyps zeigte sich eine signifikante Häufung von früheren Ileozökalresektionen bei C-insertions Genträgern (p=0,007).(Diagramm 4; Tabelle 5)



*Diagramm 4:*  
Prozentuale Verteilung der Subtypen und der Ileozökalresektion in Bezug auf den Genotyp

	C-insertions Allel +	C-insertions Allel -	
<b>Fisteln +</b>	18	37	
<b>Fisteln -</b>	5	37	p=0,029
<b>Stenosen +</b>	20	45	
<b>Stenosen -</b>	3	29	p=0,023
<b>Inflammatorischer Subtyp +</b>	0	16	
<b>Inflammatorischer Subtyp -</b>	23	58	p=0,011
<b>Ileozökalresektion +</b>	15	24	
<b>Ileozökalresektion -</b>	8	50	p=0,007

(Tabelle 5)

### 3.4. Korrelation des p-ANCA Status zu entsprechenden Genotypen

Bei 91 Patienten mit Colitis ulcerosa und 91 Patienten mit Morbus Crohn lagen Daten zum p-ANCA Status vor. 32% (29/91) der Patienten mit Colitis ulcerosa wiesen p-ANCA im Serum auf. Dagegen waren nur 2% (2/91) der Patienten mit Morbus Crohn positiv für p-ANCA. Eine Assoziation des p-ANCA Status mit einem bestimmten Genotyp der untersuchten Genvarianten im EGFR Gen, Motilin Gen und NOD2 Gen konnte nicht gezeigt werden. Tabellen 6 und 7 geben eine Übersicht über das Vorkommen von p-ANCA bei entsprechenden Genotypen.

Vorkommen von p-ANCA bei Patienten mit Morbus Crohn entsprechend des Genotyps:

<b>EGFR</b>	<b>Homozygot Allel1</b>	<b>Allel1/Allel2</b>	<b>Homozygot Allel2</b>	<b>Summe</b>
<b>p-ANCA +</b>	1	1	0	2
<b>p-ANCA -</b>	47	34	8	89
	<b>n.s. (p= 0,881)</b>			
<b>Motilin</b>	<b>Homozygot Allel1</b>	<b>Allel1/Allel2</b>	<b>Homozygot Allel2</b>	<b>Summe</b>
<b>p-ANCA +</b>	1	1	0	2
<b>p-ANCA -</b>	13	42	32	87
	<b>n.s. (p=0,322)</b>			
<b>NOD2</b>	<b>Homozygot NOD2</b>	<b>NOD2/3020insC</b>	<b>Homozygot 3020insC</b>	<b>Summe</b>
<b>p-ANCA +</b>	2	0	0	2
<b>p-ANCA -</b>	66	19	4	89
	<b>n.s.(p=0,708)</b>			

(Tabelle 6)

Vorkommen von p-ANCA bei Patienten mit Colitis ulcerosa entsprechend des Genotyps:

<b>EGFR</b>	<b>Homozygot Allel1</b>	<b>Allel1/Allel2</b>	<b>Homozygot Allel2</b>	<b>Summe</b>
<b>p-ANCA +</b>	19	9	1	29
<b>p-ANCA -</b>	38	22	2	62
	<b>n.s. (p=0,917)</b>			
<b>Motilin</b>	<b>Homozygot Allel1</b>	<b>Allel1/Allel2</b>	<b>Homozygot Allel2</b>	<b>Summe</b>
<b>p-ANCA +</b>	6	14	9	29
<b>p-ANCA -</b>	10	31	19	60
	<b>n.s. (p=0,895)</b>			
<b>NOD2</b>	<b>Homozygot NOD2</b>	<b>NOD2/3020insC</b>	<b>Homozygot 3020insC</b>	<b>Summe</b>
<b>p-ANCA +</b>	28	1	0	29
<b>p-ANCA -</b>	57	2	0	59
	<b>n.s. (p=0,999)</b>			

(Tabelle 7)

## 4. Diskussion

### 4.1. EGFR

Das Gen für den EGFR liegt innerhalb einer Kopplungsregion für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (146).

EGFR ist ein ubiquitär vorkommender Rezeptor für Wachstumsfaktoren und ihm kommt dadurch eine zentrale Rolle bei Vorgängen des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration, der Apoptose und damit der Wundheilung zu (174). Des Weiteren lassen sich in tierexperimentellen Kolitis Modellen durch Gabe von EGF die entzündlichen Reaktionen und Schleimhautschäden reduzieren (96, 125). Der genaue Mechanismus durch den EGF seine protektive Wirkung entfaltet ist ungeklärt, jedoch ist EGF in der Lage durch Stimulation der Synthese und Sekretion der Glykoproteine der Muzinschicht, die Dicke und Zusammensetzung dieser wichtigen Schutzschicht entscheidend zu beeinflussen (84, 143, 154). Erst kürzlich ist die Bedeutung der epithelialen Barrierefunktion in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in den Vordergrund gerückt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass der Darmschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa eine Schicht Bakterien der physiologischen Darmschleimhaut anhaftet, während diese bei gesunden Vergleichspersonen fehlt. Zum anderen wurde mit zunehmender Schwere der Erkrankung eine höhere Bakteriendichte nachgewiesen, sowohl in entzündlich veränderten Darmabschnitten, als auch in Abschnitten regulärer, nicht entzündlich veränderter Darmschleimhaut (160). Somit kann vermutet werden, dass die festgestellten Veränderungen nicht Folge des Entzündungsprozesses sind, sondern dass eine Störung der epithelialen Barrierefunktion diesen zu Grunde liegen und dadurch der enge Kontakt zwischen physiologischer Darmflora und Darmschleimhaut erst ermöglicht wird. Sekundär folgt das entzündliche Geschehen. Weiterhin wurde gezeigt, dass die chemische Zusammensetzung der mukosalen Barrierschicht in der Pathogenese des Morbus Crohn eine zentrale Rolle zu spielen scheint. Neben dem rein physikalischen Schutz der Muzinschicht scheint eine wesentlichere Bedeutung der epithelialen Expression spezialisierter Moleküle mit antimikrobieller Wirkung, sog. Defensine, zuzukommen. Der luminalen Epithelschicht der Darmschleimhaut steht durch konstitutiv exprimierte und induzierbare Formen der Defensine, die Teil des angeborenen Immunsystems darstellen, eine wirksame Abwehr gegenüber Pathogenen zur

Verfügung (46). Patienten mit Morbus Crohn weisen eine gestörte Induktion von Beta Defensin 2 und 3 auf, was eine fehlerhafte Schleimhautbarriere widerspiegeln könnte und somit unter weiteren Faktoren Wegbereiter des entzündlichen Prozesses darstellen könnte (47). Die Bedeutung der mukosalen Barriere wurde auch durch Untersuchungen mit immunstimulatorischer DNA verdeutlicht. In mehreren experimentellen Modellen der Colitis konnte durch Zufuhr immunstimulatorischer DNA, der entzündliche Prozess verhindert oder gemildert werden (126). In Zusammenschau der Ergebnisse postulieren die Autoren einen T-Zell unabhängigen Mechanismus und führen den protektiven Effekt zum einen auf Erhaltung der Schleimhautbarriere durch Hemmung der Apoptose und zum anderen auf Aktivierung des angeborenen Immunsystems zurück (126).

Zentral in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheinen somit die Vorgänge und Interaktionen an der Schleimhautgrenze zu sein. Als Rezeptor für EGF könnte EGFR somit eine wichtige Rolle in intestinalen mukosalen Abwehr- und Reparatonsmechanismen zukommen. Der beschriebene G/A Polymorphismus im EGFR Gen (110) führt zur Expression unterschiedlicher Rezeptorvarianten, die sich in ihrer biologischen Aktivität nach Bindung von EGF und TGF $\alpha$  unterscheiden (109). Daher kann man vermuten, dass Mutationen, welche die Funktion oder Expression von EGFR beeinträchtigen, für chronisch entzündliche Darmerkrankungen prädisponieren.

In der vorliegenden Studie war eine signifikante Häufung des Allel 1 bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu Kontrollen festzustellen. Die Allelfrequenz für Allel 2 war entsprechend erniedrigt. Die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen waren bei Patienten mit Colitis ulcerosa jedoch denen der Kontrollgruppe vergleichbar.

Allel 1 und Allel 2 kodieren für funktionell unterschiedliche Rezeptorvarianten (109) und eine Häufung von Allel 1 bei Patienten mit Colitis ulcerosa lässt eine Rolle der entsprechenden Rezeptorvariante in der Pathogenese dieser Erkrankung vermuten. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind Diskrepanzen in der Expression von EGFR mRNA im Vergleich zu Kontrollen und Patienten mit anderen Erkrankungen des Darmes beschrieben (6), allerdings wurde nicht zwischen den Rezeptorvarianten differenziert. Weiterhin wurde eine erhöhte EGFR Aktivität in rektalen Schleimhautbiopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa festgestellt, ebenso

bei Patienten mit Colonadenomen und Colonkarzinomen, im Vergleich zu Kontrollen und damit als möglicher Hinweis für einen ersten Schritt in Richtung maligner Entartung interpretiert (101). Die gemachten Aussagen wurden ebenfalls ohne Berücksichtigung der verschiedenen Rezeptorvarianten getroffen. Daten zur EGFR Allelverteilung oder Expression der Rezeptorvarianten bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen liegen in der Literatur nicht vor.

Die Beobachtungen zur unterschiedlichen biologischen Aktivität der Rezeptorvarianten wurden durch *in vitro* Untersuchungen an chinesischen Hamsterovalialzellen gewonnen (110). Der durch Allel 2 kodierte EGFR (HER497K) weist Unterschiede in der Bindungsaffinität gegenüber TGF $\alpha$  auf im Vergleich zu EGFR, der durch Allel 1 kodiert ist (HER497R). Weiterhin zeigten die Zellen, die HER 497K exprimierten, ein stark reduziertes Wachstum und nach Bindung von EGF und TGF $\alpha$  im Vergleich zu HER497R exprimierenden Zellen niedrigere mRNA Level von c-myc, c-fos und c-jun (110). *In vivo* Untersuchungen zu den Rezeptorvarianten, insbesondere bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, sind in der Literatur nicht beschrieben. Über die funktionelle Relevanz der unterschiedlichen Allelfrequenzen bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Kontrollen kann somit nur spekuliert werden.

Obwohl sich in unserer Studienpopulation die Allelfrequenzen bei Patienten mit Colitis ulcerosa im Vergleich zu Kontrollen signifikant unterschieden, waren die einzelnen Genotypen etwa gleich häufig verteilt. Homozygote für Allel 1 waren in der Gruppe der Patienten mit Colitis ulcerosa mit 64% häufiger vertreten als mit 52% in der Kontrollgruppe, doch diese Differenz erlangte keine statistische Signifikanz.

Die Untergruppe der p-ANCA positiven Patienten mit Colitis ulcerosa wies keine signifikanten Unterschiede in der EGFR Allelverteilung im Vergleich Kontrollen und zu p-ANCA negativen Patienten auf.

Vor einer abschließenden Beurteilung zur Bedeutung des EGFR Polymorphismus im genetischen Hintergrund der Colitis ulcerosa muss die Bestätigung unserer Ergebnisse durch andere Arbeitsgruppen, möglichst an größeren Fallzahlen, abgewartet werden. Weiterhin müssen Untersuchungen zur Verteilung der Rezeptorvarianten an Schleimhautbiopsien von Patienten vorgenommen werden.

Patienten mit Morbus Crohn zeigten in ihrer EGFR Allelverteilung keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrollpopulation. Auch nach Stratifizierung entsprechend des p-ANCA Status zeigte sich keine Assoziation mit einem bestimmten Genotyp.

Der untersuchte EGFR Polymorphismus scheint damit keine Rolle in der genetischen Prädisposition für Morbus Crohn zu spielen.

## 4.2. Motilin

Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn leiden an gastrointestinalen Motilitätsstörungen (7, 128). Weiterhin wurden erhöhte basale und postprandiale Motilin Serumspiegel bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu Gesunden gemessen (16). In tierexperimentellen Kolitis Modellen zeigte sich eine Herabregulation der Motilinrezeptoren in entzündlich veränderten Kolonabschnitten und eine Heraufregulation dieser Rezeptoren im Antrum (38). Diese Beobachtungen lassen eine pathogenetische Rolle des Motilins bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen vermuten.

Mehrere Polymorphismen im Motilin Gen sind beschrieben. Der Basenaustausch von Thymin zu Cytosin im Nukleotid 115 führt zu einem Austausch von Valin zu Alanin in der Aminosäuresequenz des Motilin Proteins (57). Der Aminosäureaustausch ist im Signalpeptid des Motilins lokalisiert, das eine entscheidende Rolle in der Translokation des Peptids ins endoplasmatische Retikulum spielt. Dieser Vorgang ist unabdingbar für eine spätere Sekretion des Proteins (9). Mutationen, welche die Sekretion oder Funktion des Motilin Proteins beeinträchtigen, könnten somit für chronisch entzündliche Darmerkrankungen prädisponieren. Diskutiert werden könnte auch ein Zusammenhang des beobachteten Gewichtsverlust bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Mutationen im Motilin, da Motilin strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zu Ghrelin aufweist und für beide eine Stimulation der Nahrungsaufnahme, als auch eine Stimulation der Wachstumshormonsekretion nachgewiesen werden konnte (49). Aufgrund fehlender systematischer Untersuchungen dieser Fragestellung bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist diese Hypothese bislang jedoch spekulativ.

In einer Untersuchung an 50 Patienten mit Colitis ulcerosa und 52 Patienten mit Morbus Crohn beschrieb Annese et al. eine erhöhte, jedoch nicht statistisch signifikante, Frequenz des Allel 2 des T/C Polymorphismus im Motilin Gen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen im Vergleich zu Kontrollen. Des weiteren war Allel 2 signifikant häufiger bei p-ANCA positiven Patienten mit Morbus Crohn zu finden (9).

In der vorliegenden Untersuchung fanden diese Ergebnisse teilweise Bestätigung. Die Allelfrequenzen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen unterschieden sich nicht wesentlich von

denen in der Kontrollgruppe. Allel 2 war mit 58% bei Patienten mit Colitis ulcerosa und 58% bei Patienten mit Morbus Crohn eher etwas seltener vertreten als in der Kontrollgruppe (61%).

In der Untersuchung von Annese et al. waren 13% der Patienten mit Morbus Crohn positiv für p-ANCA, in unserer Studie dagegen nur 2% (2/91). Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf ethnische Unterschiede in der jeweiligen Studienpopulation zurückzuführen.

In unserer Untersuchung war weder eine Häufung von Allel 2 in der Subgruppe der p-ANCA positiven Crohn-Patienten zu verzeichnen, noch eine Assoziation dieser Subgruppe mit einem bestimmten Genotyp des Motilin Polymorphismus festzustellen. Im Gegensatz dazu war in unserer Studie Allel 1 gehäuft bei p-ANCA positiven Crohn-Patienten vertreten. Allerdings ist eine statistische Aussage auf Grund der niedrigen Fallzahl von p-ANCA positiven Crohn-Patienten nicht möglich. Wie in der Studie von Annese et al. zeigten in unserer Untersuchung alle p-ANCA positiven Crohn-Patienten einen isolierten Kolonbefall. Dies bestätigt Beobachtungen, dass das Vorkommen von p-ANCA bei Patienten mit Morbus Crohn relativ spezifisch ist für Kolonbefall (95).

Unsere Studienpopulation umfasste etwa doppelt so viele Patienten wie die Untersuchung von Annese et al. Die Subgruppe der p-ANCA positiven Crohn-Patienten war jedoch zahlenmäßig kleiner. Um Aussagen auf statistischer Grundlage machen zu können, sollten noch größere Fallzahlen untersucht werden.

Weitere Angaben zur Häufigkeitsverteilung der Allele des beschriebenen Polymorphismus im Motilin Gen bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind in der Literatur nicht zu finden.

Eine entscheidende Bedeutung des T/C Polymorphismus im Motilin Gen im genetischen Hintergrund und der Pathogenese von Morbus Crohn erscheint somit unwahrscheinlich, ist aber nicht auszuschließen. Die Rolle des genannten Polymorphismus bei p-ANCA positiven Crohn Patienten bedarf der weiteren Klärung.

Patienten mit Colitis ulcerosa unterschieden sich in der Allelverteilung nicht von der Kontrollpopulation. Die Genotypverteilung war bei Patienten mit Colitis ulcerosa vergleichbar der in der Kontrollgruppe, auch nach Subgruppierung in p-ANCA positive und p-ANCA negative Patienten.

Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse von Annese et al.

Dem Motilin Polymorphismus scheint somit keine Rolle im genetischen Hintergrund der Colitis ulcerosa zuzukommen.

### 4.3. NOD2/CARD 15

NOD2 liegt innerhalb des IBD1 Locus, der die deutlichste Kopplung aller bisher mit Morbus Crohn assoziierten Kopplungsregionen zeigt (28). Des Weiteren ist NOD2 durch seine Funktion als Rezeptor für bakterielle Bestandteile und Aktivator von NF- $\kappa$ B ein Kandidatengene für Morbus Crohn (77).

In unserer Untersuchung wiesen 23% der Crohn-Patienten die Cytosin Insertion im Nukleotid 3020 auf, während nur 4% der Patienten mit Colitis ulcerosa und 3% der Kontrollen Träger dieser Mutation waren ( $p < 0,0001$ ). Damit bestätigen unsere Ergebnisse die beschriebene Assoziation dieser Mutation im NOD2 Gen mit Morbus Crohn (65, 73, 114).

Die in unserer Population ermittelten Allelfrequenzen der 3020insC von 14% bei Patienten mit Morbus Crohn, von 2% bei Patienten mit Colitis ulcerosa und 2% bei Kontrollen stehen in Einklang mit den bisher in der Literatur berichteten Ergebnissen. Die größte Übereinstimmung ergibt sich mit Resultaten der Arbeitsgruppe um Hugot et al (73, 90).

Der 3020insC Mutation kommt somit eine wesentliche Bedeutung im genetischen Hintergrund des Morbus Crohn zu (65). Diese Mutation ist in der kodierenden Region für die leucinreiche Domäne des NOD2 Proteins lokalisiert und bewirkt eine Verkürzung des Proteins (65, 73, 114). Die leucinreiche Domäne ist unabdingbar für die Erkennung bakterieller Bestandteile und nachfolgender NF- $\kappa$ B Aktivierung (77). Das verkürzte Protein zeigte nach Stimulation mit Lipopolysacchariden eine verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung (114) und spiegelt dadurch die funktionelle Relevanz dieser Mutation wider. Wie die Mutation jedoch zum charakteristischen entzündlichen Prozess des Morbus Crohn führt ist noch nicht geklärt. Zahlreiche Untersuchungen geben Hinweise zur möglichen pathogenetischen Einordnung. Die durch die 3020insC bedingte verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung muss nicht unbedingt im Widerspruch zu der bei Crohn-Patienten beobachteten deutlich erhöhten Expression von NF- $\kappa$ B in der Lamina propria gesehen werden (148). Neben Lipopolysacchariden sind auch Peptidoglykanbestandteile in der Lage über NOD2 NF- $\kappa$ B zu aktivieren (77). Muramyl Dipeptid, ein Peptidoglykanteilstück, wurde kürzlich als essentielle bakterielle Struktur für die Erkennung durch NOD2 identifiziert (60, 78). Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn, die homozygot für die 3020insC Mutation sind, zeigen keine NF- $\kappa$ B Aktivierung auf Stimulation mit Muramyl Dipeptid

(78). Die fehlerhafte Erkennung dieses typischen und weit verbreiteten bakteriellen Produktes durch Monozyten, die Teil des angeborenen Immunsystems darstellen, könnte zu einer überschießenden Immunreaktion des adaptiven Immunsystems führen (114). Der Zusammenhang zwischen NOD2 als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile im Rahmen des angeborenen Immunsystems und der bei Morbus Crohn beobachteten überschießenden Immunantwort des adaptiven Immunsystems konnte erst kürzlich weiter spezifiziert werden. So zeigten murine CARD 15<sup>-/-</sup> (NOD2<sup>-/-</sup>) Zellen nach Stimulation mit bakteriellem Peptidoglykan, einem Toll-like Rezeptor 2 Agonist, eine signifikant erhöhte IL-12 Produktion im Vergleich zu Wildtyp Zellen (172). Toll-like Rezeptoren stellen membranständige Rezeptoren zur Erkennung bakterieller Bestandteile dar und führen ebenso wie NOD2 zur Aktivierung von NF-κB (4, 5). Aufgrund der ihrerseits erhobenen Ergebnisse kommen die Autoren zu der Annahme, dass NOD2 physiologischerweise eine hemmende Funktion auf durch Toll-like Rezeptor 2 vermittelte Cytokinproduktion und dadurch Th1 differenzierte T-Zellantworten ausübt (172). Im Falle einer funktionellen Mutation, wie sie die 3020insC Mutation darstellt, kommt es dann auf bakterielle Reize zu einer überschießenden Th1 differenzierten Immunantwort, die charakteristisch für Morbus Crohn ist (56, 139). Weiterhin zeigten Monozyten von Patienten mit Morbus Crohn, die homozygot für die 3020insC Mutation sind, eine deutlich reduzierte Produktion des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 nach Stimulation mit Toll-like Rezeptor 2 Agonisten (112), ebenso nach Stimulation mit Muramyl Dipeptid, dem direkten Liganden von NOD2 (165). Dem mutierten NOD2 kommt somit nicht nur eine proinflammatorische Wirkung durch Aktivierung einer Th1 differenzierten Immunantwort zu, sondern auch eine fehlende antiinflammatorische Wirkung durch reduzierte Produktion von IL-10 als Antwort auf einen bakteriellen Reiz. Neben seiner Rolle als Aktivator von NF-κB besitzt NOD 2 auch eine Funktion in der Regulation der Apoptose (76). Demnach ließe sich die Diskrepanz zwischen verminderter Aktivierung von NF-κB durch das mutierte NOD 2 Protein und der Überexpression von NF-κB bei Morbus Crohn auch dadurch erklären, dass die NOD 2 Varianten unterschiedliche Effekte auf die durch Caspase-9 induzierten Apoptosemechanismen ausüben (103). Den immunologischen Vorgängen, sofern sie nicht im Rahmen eines genetischen Immundefektes interpretiert werden (50), geht der Kontakt der bakteriellen Flora mit der Darmschleimhaut voraus. Bei Patienten mit Morbus Crohn findet sich eine Schicht fäkaler Bakterien, die der Epithelschicht anhaftet, in Bereichen entzündlich und in Bereichen nicht

entzündlich veränderter Schleimhaut, und eine zunehmende Dichte mit zunehmendem Schweregrad der Erkrankung aufweist, während bei Kontrollen die Schleimhautoberfläche weitgehend steril ist (160). Möglicherweise wird die Adhäsion durch unterschiedliche Glykosylierung von Oberflächenproteinen und -lipiden der Epithelzellen bei Patienten mit Morbus Crohn ermöglicht, die mit den Oberflächenstrukturen der Bakterien in Interaktion treten (86). Weiterhin wurde bei Patienten mit Morbus Crohn eine verringerte Induktion von Beta-Defensinen nachgewiesen, welche als Peptide mit antimikrobieller Wirkung eine wichtige Funktion in Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere ausüben (47). In Biopsien entzündlich veränderter Colonschleimhaut von Patienten mit Morbus Crohn zeigte sich eine vermehrte Expression von NOD2 in Makrophagen und Colonepithelzellen (15) und damit wurde der Nachweis einer funktionellen Relevanz des NOD2 Proteins bei entzündlichen Vorgängen beim Morbus Crohn erbracht. Intestinale Epithelzellen, die NOD2 exprimieren, sind in der Lage intrazelluläre Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen, während Epithelzellen, die die 3020insC Mutation exprimieren, diese Funktion verlieren, demnach kommt NOD2 ein direkter antibakterieller Effekt zu (72). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich vermehrt invasive E.coli Stämme in ilealen Schleimhautbiopsien bei Patienten mit Morbus Crohn finden, während diese bei gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Colitis ulcerosa fehlen (35).

Neben der 3020insC Mutation sind weitere Mutationen im NOD2 Gen beschrieben und mehrere zeigen eine Assoziation zu Morbus Crohn (34, 73, 90, 114). In funktionellen Untersuchungen konnte für zwei weitere Mutationen im NOD2 Gen, die nach der 3020insC Mutation am häufigsten bei Patienten mit Morbus Crohn zu finden sind, ebenso eine verminderte NF- $\kappa$ B Aktivierung nach Kontakt mit Lipopolysacchariden und Peptidoglykan bestätigt werden (21).

Trotz der vielen offenen Fragen in der Pathogenese des Morbus Crohn scheint sich durch die gefundene Assoziation mit Mutationen im NOD2 Gen und die bisher bekannten funktionellen Konsequenzen die Hypothese zu festigen, dass dem Morbus Crohn eine genetische Disposition zu Grunde liegt und durch eine gestörte Interaktion bzw. mangelhafte Abwehr der physiologischen Darmflora an der Schleimhautbarriere in einer Immunreaktion mit nachfolgendem entzündlich-destruktiven Prozess mündet.

In einer Risikoanalyse errechnete Cuthbert et al. ein mehr als 20fach erhöhtes Risiko für homozygote Träger von NOD2 Mutationen an Morbus Crohn zu erkranken (34).

Die bisher gemachten Aussagen zur Assoziation von NOD2 Mutationen und Morbus Crohn beziehen sich alle auf Untersuchungen an europäischen bzw. amerikanischen Patienten. In zwei unabhängigen Studien an japanischen Patienten ließen sich keine der drei häufigen Mutationen nachweisen (79, 176). Weiterhin konnten auch für afro-amerikanische Patienten mit Morbus Crohn keine vergleichbaren Allelfrequenzen für die drei häufigsten bei kaukasischen Patienten vorkommenden NOD2 Mutationen festgestellt werden (20). Demnach scheinen die drei häufigsten Mutationen im NOD2 Gen keine Rolle in der genetischen Prädisposition für Morbus Crohn bei Patienten japanischer oder afro-amerikanischer Herkunft zu spielen.

Außer dem NOD2 Gen sind wahrscheinlich weitere Gene innerhalb des IBD1 Locus für dessen Kopplung mit Morbus Crohn verantwortlich (67).

Um Patienten mit der 3020insC Mutation näher zu charakterisieren, wurden Crohn-Patienten entsprechend ihres klinischen Subtyps eingeteilt und auf das Vorkommen von p-ANCA überprüft und mit ihrem jeweiligen Genotyp korreliert. Dabei zeigte sich in unserer Studie eine Häufung des fistulierenden ( $p=0,029$ ) und fibrostenotischen ( $p=0,023$ ) Subtyps unter den Mutationsträgern. Der inflammatorische Subtyp war dagegen negativ korreliert ( $p=0,011$ ). Weiterhin konnte eine Assoziation der 3020insC Mutation mit früheren Ileozökalresektionen festgestellt werden ( $p=0,007$ ). Diese Befunde sind gut vereinbar mit einer Rolle von NOD2 in transmuralen Verläufen von Morbus Crohn, die durch Stenosierung und Fistelbildung kompliziert sind und eine chirurgische Intervention nötig machen.

In einer vor kurzem publizierten Untersuchung an mehreren Hundert Patienten mit Morbus Crohn wurde die Assoziation von Mutationen im NOD2 Gen und dem fibrostenotischen Subtyp bestätigt (1, 3, 90). Der von uns beobachtete Zusammenhang zwischen dem bevorzugten Auftreten von Fisteln bei Mutationsträgern fand in der genannten Untersuchung keine Bestätigung. Lesage et al. berichteten weiterhin über gehäufte operative Interventionen bei homozygoten Trägern von Mutationen im NOD2 Gen, doch dieses Ergebnis erlangte keine statistische Signifikanz.

In unserer Untersuchung wies die Erkrankungslokalisation keine Korrelation zur 3020insC Mutation auf. Cuthbert et al. und Lesage et al. beschrieben jedoch eine Assoziation von NOD2 Mutationen und isoliertem Dünndarmbefall (34, 90). Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf die weit geringere Zahl untersuchter Patienten in unserer Studie zurückzuführen, allerdings fand sich in unserer Untersuchung eine Assoziation zu Ileozökalresektionen, die einen Befall des terminalen Ileums impliziert. Mehrere Studien geben Erklärungsansätze für die gefundene Assoziation zwischen ilealer Krankheitslokalisation und NOD2 Mutationen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass NOD2 auch in Paneth'schen Zellen, die eine entscheidende Rolle in der Abwehr enterischer Infektionen spielen, exprimiert wird und diese vorwiegend im terminalen Ileum angesiedelt sind (88). Zum anderen wurden in ilealen Schleimhautbiopsien von Patienten mit Morbus Crohn eine ungewöhnlich hohe Anzahl adhären-invasiver Escherichia coli Bakterien nachgewiesen (35). Wie erwähnt fungiert NOD2 als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile und kürzlich konnte gezeigt werden, dass invasive Bakterien in ihrem Wachstum durch NOD2-vermittelte Vorgänge gehindert werden, diese Funktion für die 3020insC Mutation jedoch nicht zutrifft (72). Weiterhin ist Morbus Crohn mit Defensin Defekten assoziiert (47, 173). Patienten mit Mutationen im NOD2 Gen zeigen insbesondere eine verminderte Expression von Alpha Defensin 5 und 6, die vorwiegend im Ileum zu finden sind (173).

Eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von p-ANCA bei Patienten mit Morbus Crohn und der 3020insC Mutation konnte in unserem Untersuchungskollektiv nicht ermittelt werden. Auf Grund der niedrigen Fallzahl der p-ANCA positiven Crohn-Patienten ist eine Aussage auf statistischer Grundlage nicht möglich und eine abschließende Bewertung bedarf weiterer Studien an größeren Fallzahlen. Daten dazu liegen in der Literatur bisher nicht vor.

Lediglich 4% der Patienten mit Colitis ulcerosa waren Träger der Insertionsmutation im NOD2 Gen, vergleichbar der Rate an Mutationsträgern in der Kontrollgruppe. Keiner dieser Patienten war homozygot für die 3020insC Mutation. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Resultaten anderer Studiengruppen, die alle keine Assoziation zwischen dieser und weiteren Mutationen im NOD2 Gen und Colitis ulcerosa fanden (65, 73, 114). Es bestätigt ebenso die fehlende Kopplung zwischen IBD1 und Colitis ulcerosa (28, 74).

Auch nach Stratifizierung entsprechend des p-ANCA Status zeigte sich keine Assoziation zur Insertionsmutation. Angaben diesbezüglich stehen in der Literatur noch aus.

In Anbetracht dieser Befunde kann zusammenfassend gesagt werden, dass der 3020insC Mutation im NOD2 Gen eine entscheidende Rolle in der genetischen Prädisposition für Morbus Crohn in Patienten westlicher Herkunft zukommt. Weiterhin sind Patienten mit dieser Mutation durch bestimmte klinische Merkmale ihrer Erkrankung charakterisiert. Die Beteiligung von NOD2 in der Pathogenese der Colitis ulcerosa erscheint unwahrscheinlich.

## 5. Zusammenfassung

Zusammenfassend lassen sich folgende Aussagen zu den untersuchten Kandidatengenen treffen.

Trotz einer Häufung von Allel 1 des G/A Polymorphismus im Nukleotid 1749 des EGFR Gens bei Patienten mit Colitis ulcerosa, zeigten die einzelnen Genotypen keine signifikant andere Verteilung im Vergleich zu Kontrollen. Patienten mit Morbus Crohn wiesen vergleichbare Allelfrequenzen zu Kontrollen auf. Auch nach Stratifizierung entsprechend des p-ANCA Status konnte keine Assoziation zu einem bestimmten Genotyp gefunden werden.

In der Literatur stehen Ergebnisse zum Vergleich aus, ebenso Untersuchungen zur funktionellen Relevanz des oben genannten Polymorphismus bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

Eine abschließende Beurteilung der Rolle von EGFR im genetischen Hintergrund der Colitis ulcerosa ist derzeit nicht möglich. Beschriebener Polymorphismus scheint in der genetischen Prädisposition für Morbus Crohn keine Relevanz zu haben.

Der T/C Polymorphismus im Nukleotid 115 des Motilin Gens zeigte vergleichbare Allelhäufigkeiten bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn, sowie Kontrollen. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen. In der vorliegenden Studie konnte keine Assoziation zwischen dem p-ANCA Status und dem Motilin Polymorphismus bei Patienten mit Morbus Crohn festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu Angaben in der Literatur. Allerdings war die Fallzahl p-ANCA positiver Morbus Crohn Patienten in vorliegender Untersuchung zu niedrig um Aussagen auf statistischer Grundlage zu treffen.

Im genetischen Hintergrund der Colitis ulcerosa erscheint der Motilin Polymorphismus nicht von Relevanz. Inwieweit seine Bedeutung bei p-ANCA positiven Morbus Crohn Patienten reicht, bedarf weiterer Klärung.

Der 3020insC Mutation im NOD2 Gen kommt eine herausragende Rolle in der genetischen Prädisposition für Morbus Crohn zu. Die vorliegende Studie bestätigt die Assoziation dieser Mutation

und Morbus Crohn. Die ermittelte Allelfrequenz von 14% bei Patienten mit Morbus Crohn ist vergleichbar mit Resultaten anderer Arbeitsgruppen.

Die Insertionsmutation bewirkt eine Verkürzung des NOD2 Proteins und damit eine Beeinträchtigung der Funktion als Rezeptor für bakterielle Bestandteile und Aktivator von NF- $\kappa$ B. Die gefundene Assoziation untermauert die derzeit favorisierte These zur Pathogenese des Morbus Crohn, die besagt, dass die Krankheit durch eine gestörte immunologische Antwort auf bakterielle/luminale Antigene in einem genetisch prädisponierten Individuum entsteht.

Weiterhin konnte eine Häufung des fibrostenotischen und fistulierenden Subtyps unter den Mutationsträgern ermittelt werden, ebenso eine erhöhte Rate an Ileozökalresektionen. Der inflammatorische Subtyp war hingegen negativ mit dem Vorliegen der Mutation korreliert. Die 3020insC Mutation birgt damit nicht nur das Risiko an Morbus Crohn zu erkranken, sondern hat auch Auswirkungen auf den klinischen Phänotyp bzw. heißt das, dass der „Morbus Crohn“ eine Sammlung verschiedener Krankheitsentitäten ist.

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa war die Insertionsmutation im NOD2 Gen nicht gehäuft zu finden und eine Rolle im genetischen Hintergrund erscheint somit unwahrscheinlich.

Die Resultate dieser Studie geben Anlass zu weitergehenden Untersuchungen. Das Ziel muss sein, die funktionelle Relevanz der 3020insC Mutation weiter zu präzisieren, um dadurch ein besseres Verständnis der Pathogenese zu gewinnen. Derzeit wird unter anderem in unserer Arbeitsgruppe an der Auswirkung der NOD2 Mutation auf die Zytokinproduktion durch Monozyten und auf Apoptosemechanismen gearbeitet. Durch ein vertieftes Wissen zu den pathogenetischen Vorgängen wird die Grundlage für die Entwicklung neuer, spezifischerer Therapien geschaffen.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) 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.
- 2) Achkar J-P, Barmada MM, Duerr RH.  
Perinuclear Neutrophil Antibodies Are Not Markers for Genetic Susceptibility or Indicators of Genetic Heterogeneity in Familial Ulcerative Colitis.  
Am J Gastroenterol (2002) **97**: 2343-2349.
- 3) Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR, Crawshaw J, Large O, De Silva A, Cook JT, Bernardo M, Cullen S, Welsh KI, Jewell DP.  
The Molecular Classification of the Clinical Manifestations of Crohn's Disease.  
Gastroenterology (2002) **122**: 854-866.
- 4) Akira S.  
Toll-like receptor signaling.  
J Biol Chem (2003) **278**: 38105-38108.
- 5) Akira S, Takeda K, Kaisho T.  
Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.  
Nat Immunol (2001) **2**: 675-680.
- 6) Alexander RJ, Panja A, Kaplan-Liss E, Mayer L, Raicht RF.  
Expression of Growth Factor Receptor-encoded mRNA by Colonic Epithelial Cells Is Altered in Inflammatory Bowel Disease.  
Dig Dis Sci (1995) **40**: 485-494.
- 7) Annese V, Bassotti G, Napolitano G, Usai P, Andriulli A, Vantrappen G.  
Gastrointestinal Motility Disorders in Patients with Inactive Crohn's Disease.  
Scand J Gastroenterol (1997) **32**: 1107-1117.
- 8) 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.
- 9) Annese V, Piepoli A, Andriulli A, Napolitano G, Bisceglia L, Zelante L, Gasparini P.  
Polymorphism of Motilin Gene in Patients with Crohn's Disease.  
Dig Dis Sci (1998) **43**: 715-719.
- 10) Asakawa A, Inui A, Momose K, Ueno N, Fujino MA, Kasuga M.  
Motilin increases food intake in mice.  
Peptides (1998) **19**: 987-990.
- 11) Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M.  
Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity Through Induction of I $\kappa$ B Synthesis.  
Science (1995) **270**: 286-290.
- 12) Bayless TM, Tokayer AZ, Polito II JM, Quaskey SA, Mellits ED, Harris ML.  
Crohn's Disease: Concordance for Site and Clinical Type in Affected Family Members – Potential Hereditary Influences.  
Gastroenterology (1996) **111**: 573-579.

- 13) Bernstein CN, Blanchard JF, Kliewer E, Wajda A.  
Cancer Risk in Patients with Inflammatory Bowel Disease. A Population-Based Study.  
Cancer (2001) **91**: 854-862.
- 14) Bernstein CN, Blanchard JF, Rawsthorne P, Wajda A.  
Epidemiology of Crohn's disease and ulcerative colitis in a central Canadian province: a population-based study.  
Am J Epidemiol (1999) **149**: 916-924.
- 15) Berrebi D, Maudinas R, Hugot J-P, Chamaillard M, Chareyre F, De Lagausie P, Yang C, Desreumaux P, Giovannini M, Cézard J-P, Zouali H, Emilie D, Peuchmaur M.  
CARD15 gene overexpression in mononuclear and epithelial cells of the inflamed Crohn's disease colon.  
Gut (2003) **52**: 840-846.
- 16) Besterman HS, Mallinson CN, Modigliani ND, Christofides AP, Ponti V, Sarson DL, Bloom SR.  
Gut Hormones in Inflammatory Bowel Disease.  
Scand J Gastroenterol (1983) **18**: 845-852.
- 17) Binder V.  
Genetic Epidemiology in Inflammatory Bowel Disease.  
Dig Dis (1998) **16**: 351-355.
- 18) Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W.  
Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease.  
Curr Opin Immunol (1999) **11**: 648-656.
- 19) Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni 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.
- 20) Bonen DK, Cho JH.  
The Genetics of Inflammatory Bowel Disease.  
Gastroenterology (2003) **124**: 521-536.
- 21) Bonen DK, Ogura Y, Nicolae DL, Inohara N, Saab L, Tanabe T, Chen FF, Foster SJ, Duerr RH, Brant SR, Cho JH, Nuñez G.  
Crohn's Disease-Associated NOD2 Variants Share a Signaling Defect in Response to Lipopolysaccharide and Peptidoglycan.  
Gastroenterology (2003) **124**: 140-146.
- 22) Brahmé F, Lindström C, Wenckert A.  
Crohn's disease in a defined population. An epidemiological study of incidence, prevalence, mortality, and secular trends in the city of Malmö, Sweden.  
Gastroenterology (1975) **69**: 342-351.
- 23) Brant S, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH.  
American families with Crohn's disease having strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12.  
Gastroenterology (1998) **115**: 1056-1061.
- 24) Brown JC, Cook MA, Dryburgh JR.  
Motilin, a gastric motor activity-stimulating polypeptide: final purification, amino acid composition, and c-terminal residues.  
Gastroenterology (1972) **62**: 401-404.
- 25) Cabré E, Gassull MA.  
Nutrition in inflammatory bowel disease: impact on disease and therapy.  
Curr Opin Gastroenterol (2001) **17**: 342-349.

- 26) Calkins BM.  
A Meta-Analysis of the Role of Smoking in Inflammatory Bowel Disease.  
Dig Dis Sci (1989) **34**: 1841-1854.
- 27) Carpenter G.  
Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens.  
Ann Rev Biochem (1987) **56**: 881-914.
- 28) Cavanaugh JA, The IBD International 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.
- 29) Cho J.  
The Nod2 Gene in Crohn's disease: Implications for Future Research Into the Genetics and Immunology of Crohn's Disease.  
Inflamm Bowel Dis (2001) **7**: 271-275.
- 30) Cho J, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickels MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless SR.  
Identification of susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD 1.  
Proc Natl Acad Sci USA (1998) **95**: 7502-7507.
- 31) Cohavy O, Bruckner D, Gordon LK, Misra R, Wei B, Eggena ME, Targan SR, Braun J.  
Colonic Bacteria Express an Ulcerative Colitis pANCA-Related Protein Epitope.  
Infect Immun (2000) **68**: 1542-1548.
- 32) Colombel J-F, Grandbastien AZ, Gower-Rousseau C, Plegat S, Evrard J-P, Dupas J-L, Gendre J-P, Modigliani R, Bélaïche J, Hostien J, Hugot J-P, Van Kruiningen H, Cortot A.  
Clinical Characteristics of Crohn's Disease in 72 Families.  
Gastroenterology (1996) **111**: 604-607.
- 33) Colombel J-F, Lemann M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas J-L, Notteghem B, Mary JY.  
A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives (GETAID).  
Am J Gastroenterol (1999) **94**: 674-678.
- 34) 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.
- 35) 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.
- 36) Das KM.  
Relationship of Extraintestinal Involvements in Inflammatory Bowel Disease. New Insights into Autoimmune Pathogenesis.  
Dig Dis Sci (1999) **44**: 1-13.
- 37) Davies L, Grosse VA, Kuchelapati R, Bothwell M.  
Genetic analysis of epidermal growth factor action: Assignment of human epidermal growth factor receptor gene to chromosome 7.  
Proc Natl Acad Sci USA (1980) **77**: 4188-4192.
- 38) Depoortere I, Van Assche G, Peeters TL.  
Motilin receptor density in inflamed and noninflamed tissue in rabbit TNBS-induced colitis.  
Neurogastroenterol Motil (2001) **13**: 55-63.

- 39) Duerr RH, Barmada MM, Zhang L, Pfulter R, Weeks DE.  
High-density genome scan in Crohn's disease shows confirmed linkage to chromosome 14q11-12.  
Am J Hum Genet (2000) **66**: 1857-1862.
- 40) Eggena M, Cohavy O, Parseghian MH, Hamkalo BA, Clemens D, Targan SR, Gordon LK, Braun J.  
Identification of Histone H1 as a Cognate Antigen of the Ulcerative-associated Marker Antibody pANCA.  
J Autoimmun (2000) **14**: 83-97.
- 41) Ekblom A, Daszak P, Kraaz W, Wakefield AJ.  
Crohn's disease after in-utero measles virus exposure.  
Lancet (1996) **348**: 515-517.
- 42) Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami H-O.  
Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement.  
Lancet (1990) **336**: 357-359.
- 43) Ekblom A, Wakefield AJ, Zack M, Adami H-O.  
Perinatal measles infection and subsequent Crohn's disease.  
Lancet (1994) **344**: 508-510.
- 44) El-Zaatari FAK, Ostato MS, Graham DY.  
Etiology of Crohn's disease: the role of Mycobacterium avium paratuberculosis.  
Trends Mol Med (2001) **7**: 247-252.
- 45) Feighner SD, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong S-S, Austin CP, Figueroa D, MacNeil D, Cascieri MA, Nargund R, Bakshi R, Abramovitz M, Stocco R, Kargman S, O'Neill G, Van Der Ploeg LHT, Evans J, Patchett AA, Smith RG, Howard AD.  
Receptor for Motilin Identified in the Human Gastrointestinal System.  
Science (1999) **284**: 2184-2188.
- 46) Fellermann K, Stange EF.  
Defensins – innate immunity at the epithelial frontier.  
Eur J Gastroenterol Hepatol (2001) **13**: 771-776.
- 47) Fellermann K, Wehkamp J, Herrlinger KR, Stange EF.  
Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome?  
Eur J Gastroenterol Hepatol (2003) **15**: 627-634.
- 48) Fisher NC, Yee L, Nightingale P, McEwan R, Gibson JA.  
Measles virus serology in Crohn's disease.  
Gut (1997) **41**: 66-69.
- 49) Folwaczny C, Chang JK, Tschöp M.  
Ghrelin and motilin: two sides of one coin?  
Eur J Endocrinol (2001) **144**: R1-R3.
- 50) Folwaczny C, Glas J, Török HP.  
Crohn's disease: an immunodeficiency?  
Eur J Gastroenterol Hepatol (2003) **15**: 621-626.
- 51) Folwaczny C, Jäger G, Schnettler D, Wiebecke B, Loeschke K.  
Search for Mumps Virus Genome in Intestinal Biopsy Specimens of Patients With IBD.  
Gastroenterology (1999) **117**: 1253-1261.
- 52) Folwaczny C, Jochum M, Noehl N, Schnettler D, Loeschke K, Fricke H.  
p-ANCA target antigens in ulcerative colitis.  
Z Gastroenterol (1998) **36**: 625-633.

- 53) Folwaczny C, Loeschke K, Schnettler D, Jäger G, Wiebecke B, Hoelscher M, Sauer T, König A, Endres SP, Fricke H.  
Endothelial Cell Autoantibodies Are a Marker of Disease Susceptibility in Inflammatory Bowel Disease but Apparently Not Linked to Persistent Measles Virus Infection.  
Clin Immunol (2000) **95**: 197-202.
- 54) 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.
- 55) Folwaczny C, Noehl N, Tschöp K, Endres SP, Heldwein W, Loeschke K, Fricke H.  
Goblet Cell Autoantibodies in Patients With Inflammatory Bowel Disease and Their First-Degree Relatives.  
Gastroenterology (1997) **113**: 101-106.
- 56) Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W.  
Disparate CD 4<sup>+</sup> 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.
- 57) Gasparini P, Grifa A, Savasta S, Merlo I, Bisceglia L, Totaro A, Zelante L.  
The motilin gene: subregional localization, tissue expression, DNA polymorphisms and exclusion as a candidate gene for the HLA-associated immotile cilia syndrome.  
Hum Genet (1994) **94**: 671-674.
- 58) 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.
- 59) Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M.  
Probiotics and antibiotics in inflammatory bowel disease.  
Curr Opin Gastroenterol (2001) **17**: 331-335.
- 60) Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamailard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ.  
Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection.  
J Biol Chem (2003) **278**: 8869-8872.
- 61) Gotoh N, Tojo A, Muroya K, Hashimoto Y, Hattori S, Nakamura S, Takenawa T, Yazaki Y, Shibuya M.  
Epidermal growth factor-receptor mutant lacking the autophosphorylation sites induces phosphorylation of Shc protein and Shc-Grb2/ASH association and retains mitogenic activity.  
Proc Natl Acad Sci USA (1994) **91**: 167-171.
- 62) Gower-Rousseau C, Salomez J-L, Dupas J-L, Marti R, Nuttens M-C, Votte A, Lemahieu M, Lemaire B, Colombel J-F, Cortot A.  
Incidence in inflammatory bowel disease in northern France (1988-1990).  
Gut (1994) **35**: 1433-1438.
- 63) Greenberg GR, Buchan AMJ, McLeod RS, Preston P, Cohen Z.  
Gut hormone responses after reconstructive surgery for ulcerative colitis.  
Gut (1989) **30**: 1721-1730.
- 64) Haga Y, Funakoshi O, Kuroe K, Kanazawa K, Nakajima H, Saito H, Murata Y, Munakata A, Yoshida Y.  
Absence of measles viral genomic sequence in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction.  
Gut (1996) **38**: 211-215.

- 65) 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 (2001) **357**: 1925-1928.
- 66) Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, MacPherson AJS, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genome wide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. Am J Hum Genet (1999) **64**: 808-816.
- 67) Hampe J, Frenzel H, Mirza MM, Croucher PJ, Cuthbert A, Mascheretti S, Huse K, Platzer M, Bridger S, Meyer B, Nurnberg 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. Proc Natl Acad Sci USA (2002) **99**: 321-326.
- 68) Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lautermann 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 (1999) **65**: 1647-1655.
- 69) Hendrickson BA, Gokhale R, Cho J. Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. Clin Microbiol Rev (2002) **15**: 79-94.
- 70) 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.
- 71) Hibi T, Ohara M, Kobayashi K, Brown WR, Toda K, Takaishi H, Hosoda Y, Hayashi A, Iwao Y, Watanabe M, Aiso S, Kawai Y, Tsuchiya M. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoprecipitation studies on anti-goblet cell antibody using a mucin producing cell line in patients with inflammatory bowel disease. Gut (1994) **35**: 224-230.
- 72) Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker H-C, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD 15/NOD2 Functions as an Antibacterial Factor in Human Intestinal Epithelial Cells. Gastroenterology (2003) **124**: 993-1000.
- 73) Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard J-P, Bélaïche J, Almer s, Tysk C, O'Morain CA, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel J-F, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature (2001) **411**: 599-603.
- 74) Hugot J-P, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I, Dupas J-L, Van Gossum A, Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel J-F, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. Nature (1996) **379**: 821-823.
- 75) Iizuka M, Chiba M, Yukawa M, Nakagomi T, Fukushima T, Watanabe S, Nakagomi O. Immunohistochemical analysis of the distribution of measles related antigen in the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. Gut (2000) **46**: 163-169.

- 76) Inohara N, Núñez G.  
The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens.  
Oncogene (2001) **20**: 6473-6481.
- 77) Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Núñez G.  
Human Nod1 Confers Responsiveness to Bacterial Lipopolysaccharides.  
J Biol Chem (2001) **276**: 2551-2554.
- 78) Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nuñez G.  
Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated Through NOD2: Implications for Crohn's Disease.  
J Biol Chem (2003) **278**: 5509-5512.
- 79) Inoue N, Tamura K, Kinouchi Y, Fukuda Y, Takahashi S, Ogura Y, Inohara N, Núñez 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.
- 80) Irvine EJ, Farrokhyar F, Swarbrick ET.  
A Critical Review of Epidemiological Studies in Inflammatory Bowel Disease.  
Scand J Gastroenterol (2001) **1**: 2-15.
- 81) Itoh Z.  
Motilin and Clinical Application.  
Peptides (1997) **18**: 593-608.
- 82) Kanazawa K, Haga Y, Funakoshi O, Nakajima H, Munakata A, Yoshida Y.  
Absence of Mycobacterium paratuberculosis DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction.  
J Gastroenterol (1999) **34**: 200-206.
- 83) Karlinger K, Györke T, Makö E, Mester Á, Tarján Z.  
The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease.  
Eur J Radiol (2000) **35**: 154-167.
- 84) Kelly SM, Hunter JO.  
Epidermal growth factor stimulates synthesis and secretion of mucus glycoproteins in human gastric mucosa.  
Clin Sci (Lond) (1990) **79**: 425-427.
- 85) Khoo UY, Bjarnason I, Donaghy A, Williams R, Macpherson A.  
Antibodies to colonic epithelial cells from the serum and colonic mucosal washings in ulcerative colitis.  
Gut (1995) **37**: 63-70.
- 86) Klemm P, Schembri MA.  
Bacterial adhesins: function and structure.  
Int J Med Microbiol (2000) **290**: 27-35.
- 87) Konturek PC, Brzozowski T, Duda A, Kwiecien S, Löber S, Dembinski A, Hahn EG, Konturek SJ.  
Epidermal growth factor and prostaglandin E2 accelerate mucosal recovery from stress-induced gastric lesions via inhibition of apoptosis.  
J Physiol Paris (2001) **95**: 361-367.
- 88) Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nuñez G, Keshav S.  
Crohn's disease and the NOD2 gene: A Role for Paneth Cells.  
Gastroenterology (2003) **125**: 47-57.
- 89) Lax I, Johnson A, Howk R, Sap J, Bellot F, Winkler M, Ullrich A, Vennstrom B, Schlessinger J, Givol D.  
Chicken Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor: cDNA Cloning, Expression in Mouse Cells, and Differential Binding of EGF and Transforming Growth Factor Alpha.  
Mol Cell Biol (1988) **8**: 1970-1978.

- 90) Lesage S, Zouali H, Cézard J-P and the EPWG-IBD group, Colombel J-F and the EPIMAD group, Belaiche and the GETAID group, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassul M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot A-S, Thomas G, Hugot J-P.  
CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease.  
Am J Hum Genet (2002) **70**: 845-857.
- 91) Levine J.  
Exogenous Factors in Crohn's Disease. A Critical Review.  
J Clin Gastroenterol (1992) **14**: 216-226.
- 92) Lichtenstein GR.  
Treatment of Fistulizing Crohn's Disease.  
Gastroenterology (2000) **119**: 1132-1147.
- 93) Lindberg E, Tysk C, Andersson K, Jänerot G.  
Smoking and inflammatory bowel disease. A case control study.  
Gut (1988) **29**: 352-357.
- 94) Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Meuwissen SGM.  
The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics.  
Scand J Gastroenterol (2001) **36 Suppl 234**: 29-40.
- 95) Lombardi G, Annese V, Piepoli A, Bovio P, Latiano A, Napolitano G, Perri F, Conoscitore P, Andriulli A.  
Antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease: clinical role and review of the literature.  
Dis Colon Rectum (2000) **43**: 999-1007.
- 96) Luck MS, Bass P.  
Effect of Epidermal Growth Factor on Experimental Colitis in the Rat.  
J Pharmacol Exp Ther (1993) **264**: 984-990.
- 97) Ma Y, Ohmen JD, Li Z, Bentley LG, McElree C, Pressman S, Targan SR, Fischel-Ghodsian N, Rotter JI, Yang HA.  
A genome-wide search identifies potential new susceptibility loci for Crohn's disease.  
Inflamm Bowel Dis (1999) **5**: 271-278.
- 98) MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF.  
Recent Developments in the Immunology of Inflammatory Bowel Disease.  
Scand J Immunol (2000) **51**: 2-9.
- 99) Maciag T.  
The human epidermal growth factor receptor-kinase complex.  
Trends Biochem Sci (1982) **7**:1-2.
- 100) Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN.  
Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice.  
Gastroenterology (1999) **116**: 1107-1114.
- 101) Malecka-Panas E, Kordek R, Biernat W, Tureaud J, Liberski PP, Majumdar AP.  
Differential activation of total and EGF receptor (EGF-R) tyrosine kinase (tyr-k) in the rectal mucosa in patients with adenomatous polyps, ulcerative colitis and colon cancer.  
Hepatogastroenterology (1997) **44**: 435-440.
- 102) Martin K, Radlmayr M, Borchers R, Heinzlmann M, Folwaczny C.  
Candidate genes colocalized to linkage regions in inflammatory bowel disease.  
Digestion (2002) **66**: 121-126.

- 103) McGovern DPB, VanHeel DA, Ahmad T, Jewell DP.  
NOD2 (CARD 15), the first susceptibility gene for Crohn's disease.  
Gut (2001) **49**: 752-754.
- 104) Merger M, Croitoru K.  
Infections in the immunopathogenesis of chronic inflammatory bowel disease.  
Semin Immunol (1998) **10**: 69-78.
- 105) Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Lizza F, Pallone F.  
Interleukin 12 Is Expressed and Actively Released by Crohn's Disease Intestinal Lamina Propria Mononuclear Cells.  
Gastroenterology (1997) **112**: 1169-1178.
- 106) Monteleone G, MacDonald TT, Wathen NC, Pallone F, Pender SLF.  
Enhancing Lamina Propria Th1 Cell Responses With Interleukin 12 Produces Severe Tissue Injury.  
Gastroenterology (1999) **117**: 1069-1077.
- 107) Montgomery SM, Ekbom A.  
Epidemiology of inflammatory bowel disease.  
Curr Opin Gastroenterol (2002) **18**: 416-420.
- 108) Montgomery SM, Morris DL, Pounder RE,  
Paramyxovirus infections in childhood and subsequent inflammatory bowel disease.  
Gastroenterology (1999) **116**: 796-803.
- 109) Moriai T, Kobrin MS, Hope C, Speck L, Korc M.  
A variant epidermal growth factor receptor exhibits altered type  $\alpha$  transforming growth factor binding and transmembrane signaling.  
Proc Natl Acad Sci USA (1994) **91**: 10217-10221.
- 110) Moriai T, Kobrin MS, Korc M.  
Cloning of a variant epidermal growth factor receptor.  
Biochem Biophys Res Commun (1993) **191**:1034-1039.
- 111) Moum B, Ekbom A, Vatn MH, Aadland E, Sauar J, Lygren I, Schulz T, Stray N, Fausa O.  
Clinical Course during the 1<sup>st</sup> Year after Diagnosis in Ulcerative Colitis and Crohn's disease. Results of a large, prospective population-based study in southeastern Norway, 1990-93.  
Scand J Gastroenterol (1997) **32**: 1005-1012.
- 112) Netea MG, Kullberg BJ, de Jong DJ, Franke B, Sprong T, Naber THJ, Drenth JPH, Van der Meer JWM.  
NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease.  
Eur J Immunol (2004) **34**: 2052-2059.
- 113) Neurath MF, Schürmann G.  
Zur Immunpathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.  
Chirurg (2000) **71**: 30-40.
- 114) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar J-P, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Núñez G, Cho JH.  
A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.  
Nature (2001) **411**: 603-606.
- 115) Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Núñez G.  
Nod2, a Nod 1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- $\kappa$ B.  
J Biol Chem (2001) **276**: 4812-4818.
- 116) Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Bentley LG, Huang ZH, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischelghodsian 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.

- 117) Olaison G, Leandersson P, Sjö Dahl R, Tagesson C.  
Intestinal permeability to polyethyleneglycol 600 in Crohn's disease. Peroperative determination in a defined segment of the small intestine.  
Gut (1988) **29**: 196-199.
- 118) Onuma EK, Amenta PS, Ramaswamy K, Lin J-C, Das KM.  
Autoimmunity in ulcerative colitis (UC): a predominant colonic mucosal B cell response against human tropomyosin isoform 5.  
Clin Exp Immunol (2000) **121**: 466-471.
- 119) 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.
- 120) Oudkerk Pool M, Ellerbroek PM, Ridwan BU, Goldschmeding R, von Blomberg BME, Peña AS, Dolman KM, Bril H, Dekker W, Nauta JJ, Gans ROB, Breed H, Meuwissen SGM.  
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.
- 121) Pallone F, Monteleone G.  
Mechanisms of tissue damage in inflammatory bowel disease.  
Curr Opin Gastroenterol (2001) **17**: 307-312.
- 122) Parkes M, Bramada 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.
- 123) Patel RT, Stokes R, Birch D, Ibboston J, Keighley MRB.  
Influence of total colectomy on serum antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease.  
Br J Surg (1994) **81**: 724-726.
- 124) Pavlovic M, Kay PH, Moriuchi J, Jacobsen PF, Papadimitriou JM.  
Taq I Polymorphism of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene in Caucasoids and Japanese.  
Hum Hered (1993) **43**: 39-44.
- 125) Procaccino F, Reinshagen M, Hoffmann P, Zeeh JM, Lakshmanan J, McRoberts JA, Patel A, French S, Eysselein VE.  
Protective Effect of Epidermal Growth Factor in an Experimental Model of Colitis in Rats.  
Gastroenterology (1994) **107**: 12-17.
- 126) 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.
- 127) 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.
- 128) Reddy SN, Bazzocchi G, Chan S, Akashi K, Villanueva-Meyer J, Yanni G, Mena I, Snape WJ.  
Colonic Motility and Transit in Health and Ulcerative Colitis.  
Gastroenterology (1991) **101**: 1289-1297.
- 129) Rees WDW, Malagelada J-R, Miller LJ, Go VLW.  
Human Interdigestive and Postprandial Gastrointestinal Motor and Gastrointestinal Hormone Patterns.  
Dig Dis Sci (1982) **27**: 321-329.

- 130) Reumaux D, Colombel JF, Masy E, Duclos B, Heresbach D, Belaiche J, Cortot A, Duthilleul P, GETAID.  
Anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in ulcerative colitis (UC) : no relationship with disease activity.  
Inflamm Bowel Dis (2000) **6**: 270-274.
- 131) Reynolds FH Jr., Todaro GJ, Fryling C, Stephenson JR.  
Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors.  
Nature (1981) **292**: 259-262.
- 132) Rhodes JM.  
Unifying hypothesis for inflammatory bowel disease and associated colon cancer.  
Lancet (1996) **347**: 40-44.
- 133) Rhodes JM, Campbell BJ.  
Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared.  
Trends Mol Med (2002) **8**: 10-16.
- 134) Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhardt AH, McLeod RS, Griffiths AM, Green T, Brettin TS, Stone V, Bull SB, Bitton, Williams CN, Greenberg GR, Cohen Z, Lander ES, Hudson TJ, Siminovitch KA.  
Genome wide Search in Canadian Families with Inflammatory Bowel Disease Reveals Two Novel Susceptibility Loci.  
Am J Hum Genet (2000) **66**: 1863-1870.
- 135) Robertson DJ, Sandler RS.  
Measles Virus and Crohn's Disease: A Critical Appraisal of the Current Literature.  
Inflamm Bowel Dis (2001) **7**: 51-57.
- 136) Roozendaal C, Pogány K, Horst G, Jagt TG, Kleibeuker JH, Nelis GF, Limburg PC, Kallenberg CGM.  
Does analysis of the antigenic specificities of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies contribute to their clinical significance in the inflammatory bowel diseases?  
Scand J Gastroenterol (1999) **34**: 1123-1131.
- 137) Roozendaal C, Pogány K, Hummel EJ, Horst G, Dijkstra G, Nelis GF, Limburg PC, Kleibeuker JH, Kallenberg CG.  
Titres of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease are not related to disease activity.  
QJM (1999) **92**: 651-658.
- 138) Rosenfeld DJ, Garthwaite TL.  
Central administration of motilin stimulates feeding in rats.  
Physiol Behav (1987) **39**: 753-756.
- 139) Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Schott H.  
Cytokine Profiles Differ in Newly Recruited and Resident Subsets of Mucosal Macrophages From Inflammatory Bowel Disease.  
Gastroenterology (1997) **112**: 1493-1505.
- 140) Rump JA, Schölmerich J, Gross V, Roth M, Helfesrieder R, Rautmann A, Ludemann J, Gross WL, Peter HH.  
A new type of perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody (p-ANCA) in active ulcerative colitis but not in Crohn's disease.  
Immunobiology (1990) **181**: 406-413.
- 141) Sachar DB, Andrews H, Farmer RG, Pallone F, Pena AS, Prantera C, Rutgeerts P.  
Proposed classification of patient subgroups in Crohn's disease. Working team report 4.  
Gastroenterol Int (1992) **3**: 141-145.
- 142) Samson WK, Lumpkin MD, Nilaver G, McCann SM.  
Motilin: a novel growth hormone releasing agent.  
Brain Res Bull (1984) **12**: 57-62.

- 143) Sarosiek J, Bilski J, Murty VL, Slomiany A, Slomiany BL.  
Role of salivary epidermal growth factor in the maintenance of physicochemical characteristics of oral and gastric mucosal mucus coat.  
Biochem Biophys Res Commun (1988) **152**: 1421-1427.
- 144) Sartor RB.  
Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease.  
Curr Opin Gastroenterol (2001) **17**: 324-330.
- 145) Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP.  
Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease.  
Gut (1996) **38**: 738-741.
- 146) 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.  
Nature Genetics (1996) **14**: 199-202.
- 147) Satsangi J, Rosenbergh WMC, Jewell DP.  
The prevalence of inflammatory bowel disease in relatives of patients with Crohn's disease.  
Eur J Gastroenterol Hepatol (1994) **6**: 413-416.
- 148) Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J.  
Activation of nuclear factor  $\kappa$ B in inflammatory bowel disease.  
Gut (1998) **42**: 477-484.
- 149) Schultsz C, Van den Berg FM, Ten Kate FW, Tytgat GNJ, Dankert J.  
The Intestinal Mucus Layer From Patients With Inflammatory Bowel Disease Harbors High Numbers of Bacteria Compared With Controls.  
Gastroenterology (1999) **117**: 1089-1097.
- 150) Seibold F, Weber P, Jenss H, Wiedmann KH.  
Antibodies to a trypsin sensitive pancreatic antigen in chronic inflammatory bowel disease: specific markers for a subgroup of patients with Crohn's disease.  
Gut (1991) **32**: 1192-1197.
- 151) Sellon RK, Tonkonogy S, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick DM, Sartor RB.  
Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice.  
Infect Immun (1998) **66**: 5224-5231.
- 152) Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M.  
Incidence in inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaboration Study on Inflammatory Bowel Disease ( EC-IBD).  
Gut (1996) **39**: 690-697.
- 153) Sinha A, Nightingale JMD, West KP, Berlanga-Acosta J, Playford RJ.  
Epidermal Growth Factor Enemas with Oral Mesalamine for Mild-to-Moderate Left-Sided Ulcerative Colitis or Proctitis.  
New Engl J Med (2003) **349**: 350-357.
- 154) Skov OP.  
Role of epidermal growth factor in gastroduodenal mucosal protection.  
J Clin Gastroenterol (1988) **10 Suppl 1**: 146-151.
- 155) Smith IS, Young S, Gillespie G, O'Connor J, Bell JR.  
Epidemiological aspects of Crohn's disease in Clydesdale 1961-1970.  
Gut (1975) **16**: 62-67.
- 156) Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G,  
Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease?  
Gastroenterology (1999) **117**: 65-72.

- 157) Soetikno RM; Lin OS, Heidenreich PA, Young HS, Blackstone MO.  
Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: a meta-analysis.  
Gastrointest Endosc (2002) **56**: 48-54.
- 158) Solomon MJ, Schnitzler M.  
Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Bias, Epidemiology, Surveillance, and Treatment.  
World J Surg (1998) **22**: 352-358.
- 159) Stenson WF.  
Mechanisms of tissue protection and repair in inflammatory bowel disease.  
Curr Opin Gastroenterol (2001) **17**: 313-317.
- 160) Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Diemel M, Lochs H.  
Mucosal Flora in Inflammatory Bowel Disease.  
Gastroenterology (2002) **122**: 44-54
- 161) Tarnawski A, Szabo IL, Husain SS; Soreghan B.  
Regeneration of gastric mucosa during ulcer healing is triggered by growth factors and signal transduction pathways.  
J Physiol Paris (2001) **95**: 337-344.
- 162) 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.
- 163) Thorne BA, Plowman GD.  
The Heparin-Binding Domain of Amphiregulin Necessitates the Precursor Pro-Region for Growth Factor Secretion.  
Mol Cell Biol (1994) **14**: 1635-1646.
- 164) Tobin MV, Logan RFA, Langman MJS, Langman MJS, McConnell RB, Gilmore IT.  
Cigarette Smoking and Inflammatory Bowel Disease.  
Gastroenterology (1987) **93**: 316-321.
- 165) Torok HP, Glas J, Schaaf A, Wagner S, Hauser C, Neth P, Ochsenkühn T, Schnitzler F, Seiderer J, Lohse P, Mussack T, Folwaczny C.  
Monocytic TNF $\alpha$  and Il-10 release according to CARD 15 genotype.  
Zur Publikation eingereicht
- 166) Tysk C.  
Genetic susceptibility in Crohn's Disease – Review of Clinical Studies.  
Eur J Surg (1998) **164**: 893-896.
- 167) Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-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.
- 168) Vantrappen G, Janssens J, Peeters TL,  
Motilin and the interdigestive migrating motor complex in man.  
Dig Dis Sci (1979) **24**: 497-500.
- 169) Vasilias EA, Plevy SE, Landers CJ, Binder SW, Ferguson DM, Yang H, Rotter JJ, Vidrich A, Targan SR.  
Perinuclear Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies in Patients With Crohn's Disease Define a Clinical Subgroup.  
Gastroenterology (1996) **110**: 1810-1819.
- 170) Wahl C, Liptay S, Adler G, Schmid RM.  
Sulfasalazine: a Potent and Specific Inhibitor of Nuclear Factor Kappa B.  
J Clin Invest (1998) **101**: 1163-1174.

- 171) Wakefield A, Ekbom AJ, Dhillon AP, Pittilo RM, Pounder RE.  
Crohn's disease : pathogenesis and persistent measles virus infection.  
Gastroenterology (1995) **108**: 911-916.
- 172) Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, Strober W.  
NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses.  
Nat Immunol (2004) **5**: 800-808.
- 173) Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Müller O, Herrlinger KR, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF.  
Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in Crohn's disease and ulcerative colitis.  
Inflamm Bowel Dis (2003) **9**: 215-223.
- 174) Wells A.  
Molecules in focus. EGF receptor.  
Int J Biochem Cell Biol (1999) **31**: 637-643.
- 175) Yamamoto T, Allan RN, Keighley MRB.  
Effect of Fecal Diversion Alone on Perianal Crohn's Disease.  
World J Surg (2000) **24**: 1258-1263.
- 176) 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**: 469-472.
- 177) Yang H, McElree C, Roth M-P, Shanahan F, Targan SR, Rotter JI.  
Familial empirical risks for inflammatory bowel disease: differences between Jews and non-Jews.  
Gut (1993) **34**: 517-524.
- 178) Yang S-K, Loftus EV Jr., Sandborn WJ.  
Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease in Asia.  
Inflamm Bowel Dis (2001) **7**: 260-270.
- 179) Yano H, Seino Y, Fujita J, Yamada Y, Inagaki N, Takeda J, Bell GI, Eddy RL, Fan Y-S, Byers MG, Shows TB, Imura H.  
Exon-intron organization, expression, and chromosomal localization of the human motilin gene.  
FEBS Lett (1989) **249**: 248-252.
- 180) You CH, Chey WY, Lee KY.  
Studies on Plasma Motilin Concentration and Interdigestive Motility of the Duodenum in Humans.  
Gastroenterology (1980) **79**: 62-66.

## 7. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Hr. Priv.-Doz. Dr. C. Folwaczny, Medizinische Poliklinik der LMU München, Standort Innenstadt, für die Vergabe des interessanten Themas und die Unterstützung und Anteilnahme an den Fortschritten der Doktorarbeit.

Bei Frau Katja Martin bedanke ich mich ganz herzlich für die vorbildliche Einarbeitung und Betreuung, ihre permanenten Bemühungen und die anregenden Diskussionen. Ihr unerwarteter, früher Tod hat mich tief getroffen.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Helga-Paula Török für die gute Zusammenarbeit, für ihre immer wieder bewiesene Hilfsbereitschaft und für die vielen wissenschaftlichen Debatten.

Bei Herrn Jürgen Glas möchte ich mich für seine fachliche Kompetenz bei Fragen zur Methodik bedanken.

Herrn David Radlmayr und Kollegen von Rhode & Schwarz bin ich für deren essentielle computertechnische Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Meinen Eltern danke ich herzlich für das hilfreiche Korrekturlesen und ihre Bemühungen zu meiner Entlastung. Meinem Mann bin ich zu größtem Dank verpflichtet für dessen Unterstützung auf vielfältige Weise.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Mirjam Osthoff, geb. Radlmayr  
 Geburtsdatum: 19.05.1978  
 Geburtsort: Dachau  
 Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

1984 – 1988	Volksschule	Haimhausen
1988 - 1989	Carl-Orff-Gymnasium	Unterschleissheim
1989 - 1991	Deutsche Schule Peking	Beijing, China
1991 - 1992	Shanghai American School	Shanghai, China
1992 - 1994	Carl-Orff-Gymnasium	Unterschleissheim
1994 - 1995	Rockwall High School	Rockwall, TX, USA
	<i>1995 High School Diploma</i>	
1995 - 1997	Carl-Orff-Gymnasium	Unterschleissheim
	<i>1997 Allgemeine Hochschulreife</i>	
1997 - 2003	<i>Stipendium der Bayerischen Begabtenförderung</i>	

Beruflicher Werdegang

1997-2003                      Studium der Humanmedizin                      LMU München

*8/1999 Ärztliche Vorprüfung*

*8/2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

*10/2000 USMLE Step 1 (United States Medical Liscensing Examination)*

*9/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

Praktisches Jahr: 1. Tertial: Chirurgie                      Krankenhaus München-Harlaching

2. Tertial: Dermatologie                      University of Dundee, Schottland

University of Birmingham, England

3. Tertial: Innere Medizin                      Regionalspital Laufenburg, Schweiz

*12/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

*2/2004 USMLE Step 2 (United States Medical Liscensing Examination)*

01-09/2004      Ärztin im Praktikum, Innere Medizin, Medizinische Poliklinik der LMU München

Seit 10/2004      Assistenzärztin, Innere Medizin, Medizinische Poliklinik der LMU München