

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

Funktionelle Bedeutung der NOD2/CARD15 Mutationen beim Morbus Crohn

DISSERTATION

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

vorgelegt von

Vanessa Beynon

aus

Backnang

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Stephan Brand
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Elke Holinski-Feder
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Tim M. Strom Prof. Dr. med. Hermann Fießl
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Helga-Paula Török
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR
Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.2009

Teile dieser Dissertation wurden vorab wie folgt veröffentlicht:

Beynon, V., Cotofana, S., Brand, S., Lohse, P., Mair, A., Wagner, S., Mussack, T., Ochsenkuhn, T., Folwaczny, M., Folwaczny, C., Glas, J., Torok, H.P., 2008. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1033-1040.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie	1
1.2 Das Krankheitsbild Morbus Crohn und seine Therapie	3
1.3 Zur Ätiologie des Morbus Crohn	6
1.3.1 Genetische Faktoren	7
1.3.2 Das mukosale Immunsystem	10
1.3.3 Umweltfaktoren	17
1.4 NOD2	20
1.5 Apoptose	23
1.5.1 Apoptose	23
1.5.2 Apoptose und Morbus Crohn	29
1.6 Zielsetzung der Arbeit	31
2 Material und Methoden	33
2.1 Labormaterial und Geräte	33
2.2 Probenmaterial	38
2.2.1 Probandenbeschreibung	38
2.2.2 Isolation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs)	38
2.2.3 Isolation von Monozyten und Lymphozyten	39
2.2.4 Isolation der mononukleären Zellen aus der Lamina propria (LPMC)	41
2.3 Stimulation der Zellpopulationen	42
2.3.1 Stimulation für die Zytokinanalyse	42
2.3.2 Stimulation für die Apoptoseanalyse	42
2.4 Zytokinmessung mittels ELISA	43

2.5 Nachweis apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung	43
2.6 Durchflusszytometrie	45
2.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	45
2.7 Molekularbiologische Methoden	48
2.7.1 Isolation genomischer DNA	48
2.7.2 Genotypisierung	49
2.8 Statistische Auswertung	51
3 Ergebnisse	53
3.1 Ergebnisse der genetischen Analyse	53
3.1.1 Untersuchungskollektiv	53
3.2 Zytokinanalyse	54
3.2.1 Untersuchungskollektiv	54
3.2.2 TNF- α -Freisetzung	55
3.2.3 IL-10-Freisetzung	57
3.2.4 IL-12p40-Freisetzung	59
3.2.5 IL-1 β -Freisetzung	62
3.3 Apoptoseuntersuchungen	65
3.3.1 Vorbemerkungen	65
3.3.2 Verwendung eines Vollblut-Modells	65
3.3.3 Einfluß einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von PBMCs	65
3.3.4 Einfluss einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von Monozyten	71
3.3.5 Einfluss einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von Lymphozyten	76
3.3.6 Einfluss einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von LPMCs	77
4 Diskussion	79
4.1 Diskussion der Zytokinerggebnisse	80
4.2 Diskussion der Apoptoseergebnisse	84
4.3 Methodendiskussion	87
4.4 Ausblick	90
5 Zusammenfassung	92

Literaturverzeichnis.....	95
Abbildungsverzeichnis.....	113
Tabellenverzeichnis.....	116
Verwendete Abkürzungen	117
Lebenslauf	119
Danksagungen	120

1 Einleitung

Morbus Crohn stellt neben der Colitis ulcerosa die Hauptgruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) dar. Er ist charakterisiert durch chronisch rezidivierende, in Schüben verlaufende Entzündungen der Darmmukosa. Patienten werden aufgrund anamnestischer, labordiagnostischer, radiologischer, endoskopischer und histologischer Untersuchungen einer dieser Krankheiten zugeordnet, wobei Überschneidungen bei den unterschiedlichen Krankheitsentitäten der CED oft nicht ausgeschlossen werden können. Ein Zusammenspiel aus genetischen und immunregulatorischen Faktoren und Umwelteinflüssen wird zwar vermutet, die genaue Ätiologie der CED bleibt jedoch weitgehend unklar. Morbus Crohn ist allgemein nicht mit einer erhöhten Mortalität assoziiert, jedoch führt diese Erkrankung bei den betroffenen Personen zu einer erhöhten Morbidität und einem Verlust von Lebensqualität.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit dem Morbus Crohn, weshalb die Colitis ulcerosa nur am Rande erwähnt werden soll.

1.1 Epidemiologie

Epidemiologische Studien von CED sind aufgrund verschiedener Faktoren sehr anspruchsvoll in ihrer Durchführung. Die Diagnosestellung kann sich trotz endoskopischer und histologischer Untersuchungsmethoden als sehr schwierig herausstellen und erfordert häufig weitere Kontrolluntersuchungen. Außerdem ist der Vergleich von epidemiologischen Studien aus unterschiedlichen Ländern problematisch, da neben der Schwierigkeit der vergleichbaren Diagnosekriterien auch kulturelle Unterschiede bestehen.

**Inzidenz,
Prävalenz und zeit-
liche Dynamik**

Morbus Crohn wurde erstmals von Giovanni Battista Morgagni (1682-1771), 1904 von Antoni Lesniowski (Kirsner, 1988) und 1913 von Kenneth Dalziel beschrieben (Dalziel, 1913). Neunzehn Jahre später veröffentlichte Dr. Burrill B. Crohn eine Beschreibung mehrerer Erkrankter und gab diesem Krankheitsbild den Namen terminale Ileitis bzw. regionale Ileitis (BB Crohn, 1932). Später wurde die Erkrankung nach diesem Erstbeschreiber umbenannt.

Die historisch höchsten Prävalenzen wurden in Studienzentren in Skandinavien, Großbritannien und den Vereinigten Staaten von Amerika erhoben, wobei stets die höchste Prävalenz in der jüdischen Bevölkerung zu verzeichnen war.

Prävalenzen für Morbus Crohn rangieren in Nordamerika zwischen 26 und 198,5/100.000 Personen. Die Inzidenzraten stiegen zwischen den späten Fünfzigern und den frühen Siebzigern rapide an, scheinen sich jedoch stabilisiert zu haben und liegen im Moment im Mittel bei 3,1 bis 14,6/100.000 Personen (Loftus, 2002).

In Europa liegt die Prävalenz von Morbus Crohn zwischen 8,3 und 214/100.000 Personen. Die Inzidenzraten in Europa liegen zwischen 0,7 und 9,8/100.000 Personen. Im Gegensatz zu Südeuropa, wo die Inzidenzraten für den Morbus Crohn steigen, scheinen sich in Nordeuropa mit Ausnahme von Nordost-Schottland die Inzidenzraten stabilisiert zu haben (Shivananda, 1996).

Nord-Süd-Gefälle

Ein Nord-Süd-Gefälle von CED wurde erstmals in Europa beobachtet, so werden die höchsten Prävalenzraten in Großbritannien, die niedrigsten in Kroatien beschrieben. Auf dem nordamerikanischen Kontinent konnte ein solches Nord-Süd-Gefälle ebenfalls beobachtet werden (Sonnenberg, 1991). Problematisch zu bewerten ist jedoch, dass in den verschiedenen Zentren unterschiedliche Kriterien zur Diagnosestellung angewendet wurden und somit ein direkter Vergleich der Prävalenzen schwierig ist. In einer europaweiten Studie (EC-IBD) wurde versucht dieses Problem durch Kooperation und allgemeine Standardisierung der Diagnosekriterien zu umgehen. Diese Studie konnte erstmals ein Nord-Süd-Gefälle bestätigen, räumte jedoch ein, dass dieses Gefälle durch steigende Inzidenzen in Südeuropa geringer als erwartet war und dass sich möglicherweise in Zukunft Nord und Süd angleichen könnten (Shivananda, 1996).

In Asien ist die Prävalenz und Inzidenz von CED verglichen mit den westlichen Industrienationen sehr gering. In den letzten 20 Jahren jedoch steigt vor allem die Inzidenz von Colitis ulcerosa, eine Entwicklung welche möglicherweise durch Industrialisierung und Annahme von westlichem Lebensstil erklärbar sein könnte (Yang, 2000).

**Geschlechterver-
teilung**

Morbus Crohn in Gegenden mit hoher Prävalenz scheint weiblich dominiert zu sein,

in Gegenden mit niedrigen Prävalenzen jedoch männlich. Für die Colitis ulcerosa hingegen wird in den meisten Studien ein geringfügig höherer Männeranteil beschrieben.

Bei dem Morbus Crohn liegt ein bimodales Erkrankungsalter mit einem ersten deutlichen Erkrankungsgipfel in der zweiten und dritten Lebensdekade und einem weiteren deutlich geringer ausgeprägten in der sechzigsten und siebzigsten Lebensdekade. Etwa 10% aller Erstdiagnosen werden in Individuen < 18 Jahre gestellt (Andres, 1999).

Zeitpunkt der Erstdiagnose

Ethnische Unterschiede scheinen einer gewissen Dynamik unterworfen. Einwanderer aus Gegenden mit niedrigen Prävalenzen und Inzidenzen von CED zeigen in der zweiten bis dritten Generation nach Einwanderung in Gegenden mit höherer Prävalenz eine Steigerung dieser Zahlen. Dennoch ist die Inzidenzrate von Nicht-Kauasiern generell geringer, wie eindrücklich in Nordamerika zu sehen ist. Einwanderer mit lateinamerikanischer oder asiatischer Abstammung weisen eine deutlich geringere Inzidenzrate auf, welche auch in den nachfolgenden Generationen zu verzeichnen ist. Dagegen konnte bei Afroamerikanern eine Angleichung der Inzidenzraten an die der weißen Bevölkerung beobachtet werden (Loftus, 2002).

Ethnische und sozioökonomische Unterschiede

Einen deutlichen ethnischen Zusammenhang der Inzidenz von CED ist in der jüdischen Bevölkerung zu sehen. So haben Ashkenazi-Juden in Nordamerika eine 2-4fach erhöhte Inzidenz und eine 2-9fach erhöhte Prävalenz von CED (Bonon, 2003a).

Sozioökonomische Unterschiede scheinen auch eine Rolle zu spielen, so wurde in Stadtgebieten eine höhere Prävalenz und Inzidenzrate als in ländlichen Gebieten beobachtet (Andres, 1999).

1.2 Das Krankheitsbild Morbus Crohn und seine Therapie

Morbus Crohn befällt segmental und transmural vor allem die Mukosa des terminalen Ileums. Im Gegensatz zu der Colitis ulcerosa kann der Morbus Crohn die Mukosa des gesamten Verdauungstraktes betreffen.

Charakteristisch für den Morbus Crohn sind rezidivierende, teils kolikartige abdominelle Schmerzen, bevorzugt lokalisiert im Unterbauch, verbunden mit chroni-

Klinik

schen meist nicht blutigen Diarrhöen. Gewichtsverlust tritt in bis zu 60% der Patienten auf (Stange, 2006). Im Krankheitsverlauf kommt es in vielen Fällen zu verschiedenen Komplikationen wie unter anderem Darmstenosen, Fisteln, Abszessen und Malabsorption.

Extraintestinale Manifestationen

Extraintestinale Manifestationen wie Erythema nodosum und Arthritis treten bei über 50% der Patienten auf und korrelieren dabei meist mit der Entzündungsaktivität im Darm (Rogler, 2004). Das gleichzeitige Auftreten solcher extraintestinaler Manifestationen unterstreicht dabei die systemische Natur der CED (Raedler, 1992). Weitere extraintestinale Manifestationen sind dermatologische Manifestationen wie Erythema nodosum und Pyoderma gangraenosum und auch ophthalmologische Manifestationen wie Uveitis.

Lokalisation und Klassifikationen

Die häufigsten Lokalisationen sind das terminale Ileum und der proximale Kolon. Ein isolierter Ileumbefall wird in 30% der Fälle beobachtet, ein isolierter Kolonbefall in 25% der Fälle und ein kombinierter Befall beider Abschnitte in 45% der Fälle.

Eine systematische Einteilung bezüglich der Lokalisation, des Verlaufs, des Erstmanifestationsalters sowie weiterer Eigenschaften wie Geschlecht, ethnische Herkunft und Familienanamnese wurde durch die Vienna-Klassifikation von 1998 vorgenommen (Gasche, 2000).

Eine Quantifizierung der Symptome wird anhand des Crohn's Disease Activity Index (CDAI) durchgeführt, wobei ein Ergebnis unter 150 Punkte im CDAI als Remission definiert ist (Best, 1976).

Als weitere Möglichkeit der Klassifikation des Morbus Crohn wird das Ansprechen auf Medikamente herangezogen. Dabei wird hauptsächlich zwischen *Steroid-Respondern* und *Non-Respondern* unterschieden.

Makroskopische Befunde

Makroskopisch zeigt sich eine transmurale Entzündung bei segmentaler Ausdehnung mit ödematöser sowie fibrosierender Verdickung der Darmwand. Außerdem kann es zu dem sogenannten Pflastersteinphänomen kommen, welches dadurch entsteht, dass sich entzündete Schleimhaut mit tiefen Ulzerationen abwechselt und dadurch ein pflastersteinartiges Aussehen ergibt. In manchen Fällen kann es auch zu einem Konglomerattumor kommen, bei dem verschiedene Darmabschnitte miteinander verkleben.

Histologische Befunde

Histologisch ist ein vorwiegend aus Makrophagen und Lymphozyten bestehendes

Infiltrat mit aphtenähnlichen Ulzerationen und eventuell tieferen Fissuren im Verlauf der Erkrankung nachweisbar. Charakteristisch sind in 40% der Fälle Epitheloidzellgranulome, weiterhin können häufig eine Hyperplasie der regionalen Lymphknoten sowie eine Lymphangiektasie nachgewiesen werden.

Durch den transmuralen Entzündungsprozess kann es zu einem fibrotischen Umbau in der Darmwand kommen und konsekutiv zu einer stenotischen Einengung des Darmlumens, aber auch zur Ausbildung von Fisteln unterschiedlicher Lokalisationen. Bei ausgeprägter Einengung des Darmlumens durch fibrostenotische Vernarbungen kann es zu Passagebehinderungen bis hin zum Ileus kommen. Weitere Komplikationen entstehen durch Fistelbildung und Abszessformation. Karzinome des Dünndarms und Kolonkarzinome können bei einer längeren Dauer der Erkrankung auftreten (Ekbohm, 1990; Solomon, 1998). Weiterhin kann es durch die gestörte Absorption von Nahrungsmitteln und durch den vermehrten Gebrauch von Kortikosteroiden zu einer Osteoporose kommen (Vestergaard, 2004). Durch die veränderte Leber-Darmpassage kommt es zu einem gehäuften Auftreten von Gallensteinen (Williams, 1987).

Komplikationen

Die Diagnostik eines Morbus Crohn wird mithilfe von anamnestischen Angaben, labormedizinischen, endoskopischen, histologischen und radiologischen Befunden gestellt. In vielen Fällen ist die genaue Einteilung zu einer der Entitäten des CED nicht möglich. In bis zu 10-15% der Fälle wird die Diagnose Morbus Crohn im Laufe des ersten Jahres zur Diagnose Colitis ulcerosa verändert. CED, die auf den Kolon beschränkt sind und nicht eindeutig dem Morbus Crohn oder der Colitis ulcerosa zugerechnet werden können, werden als Colitis indeterminata bezeichnet (Stange, 2006). Die diagnostische Einteilung von Pathologien des Dünndarms durch die traditionelle Endoskopie kann sich als schwierig herausstellen und wird in manchen Fällen mit der sogenannten Video-Kapselendoskopie supplementiert.

Diagnostik

Bezüglich der Therapie des Morbus Crohn muss zunächst unterschieden werden, ob ein akuter Schub therapiert wird oder ob es sich um eine remissionserhaltende Therapie handelt. Ziel der Schubtherapie ist die Linderung der Symptome einer akuten Verschlechterung, durch die remissionserhaltende Therapie soll die Anzahl der Schübe verringert werden.

Therapie

Die Therapie beinhaltet im akuten Schub zunächst die Einhaltung einer ballaststoffarmen, leicht resorbierbaren Diät mitunter auch mithilfe von parenteraler Ernährung. Medikamentös kommen Antibiotika, Aminosalicylate, Kortikosteroide in lokaler oder

bei schweren Verläufen systemischer Verabreichungsform und Immunsuppressiva zum Einsatz. Bei durch die zuvor genannten Therapeutika nicht zu beherrschenden Krankheitsausprägungen werden Antikörper, z.B. Infliximab, gegen das proinflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor- (TNF)- α eingesetzt. Beachtet werden muss hierbei, dass es unter dieser Therapie zu einer Reaktivierung einer Tuberkulose kommen kann.

Zur Remissionserhaltung sowie bei chronisch aktivem Verlauf werden in erster Linie Purinanaloga wie Azathioprin und 6-Mercaptopurin oder Methotrexat eingesetzt. Chirurgische Maßnahmen sind nur im Falle von Komplikationen nach dem Prinzip einer darmerhaltenden *minimal surgery* indiziert; weiterhin haben sie eine Bedeutung in der Therapie von anorektalen Abszessen und Fisteln.

Prognose

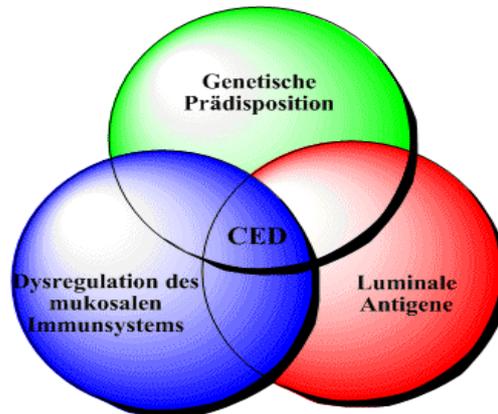
Der Morbus Crohn weist einen chronischen und intermittierenden Verlauf mit hoher Rezidivrate auf. Der typische Verlauf ist schubweise mit einer Rezidivhäufigkeit von 30% nach einem Jahr und 40% nach zwei Jahren.

Im Gegensatz zu früheren Daten besteht bezüglich des Überlebens kaum ein Unterschied zwischen CED-Patienten und der Normalbevölkerung. Lediglich in sehr großen Studien konnte noch eine gering, aber signifikant erhöhte Sterblichkeit nachgewiesen werden (Ekbohm, 1992; Jess, 2007; Jess, 2002).

1.3 Zur Ätiologie des Morbus Crohn

Die Pathogenese des Morbus Crohn ist noch weitgehend unklar, jedoch wird ein komplexes Zusammenspiel aus genetischen Suszeptibilitätsfaktoren, Umweltfaktoren und einer Dysregulation des Immunsystems vermutet. Es wird angenommen, dass diese Faktoren sich in einem empfindlichen Gleichgewicht komplementieren, welches bei bestimmten Individuen gestört sein kann und dadurch zur Ausprägung des Krankheitsbildes Morbus Crohn führen kann. Im Folgenden möchte ich zunächst auf jede drei dieser Faktoren im Einzelnen eingehen.

Abbildung 1-1: Modell zur Ätiologie des Morbus Crohn



1.3.1 Genetische Faktoren

Mehrere Aspekte der epidemiologischen Forschung von Morbus Crohn stützen die Theorie eines starken Einflusses der Genetik in der Pathogenese der Erkrankung. Zum einen sind die schon oben erwähnten ethnischen Unterschiede bedeutsam, welche nicht allein durch geographische Unterschiede zu erklären sind. Weiterhin wurden in Zwillingsstudien erhöhte Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen (35-58%) im Vergleich zu dizygoten Zwillingen (3-7%) festgestellt (Bonon, 2003a; Orholm, 2000; Thompson, 1996; Tysk, 1988; Spehlmann, 2008). Eine alleinige genetische Ätiologie kann jedoch aufgrund der nicht 100%igen Konkordanz ausgeschlossen werden. Auch das gehäufte Auftreten von Morbus Crohn in Familien konnte in mehreren Studien eine Relevanz genetischer Faktoren belegen. So ist bei 5-10% aller Patienten eine positive Familienanamnese zu erheben, wodurch diese als wichtigster Risikofaktor zu sehen ist (Bonon, 2003a; Farmer, 1980; Monsen, 1991; Russel, 1997). Ebenso ist eine Konkordanz der Krankheitscharakteristika wie Lokalisation, Ausprägung und Erstmanifestationsalter innerhalb der Familien festzustellen (Bayless, 1996; Folwaczny, 1998; Folwaczny, 1997; Schreiber, 2002). Interessant ist auch die Beobachtung, dass sich innerhalb einer Familie über die Generationen hinweg das Erstmanifestationsalter zu einem früheren Zeitpunkt hin verschiebt (Colombel, 1996; Polito, 1996; Schreiber, 2002). In diesen Familienstudien lässt sich auch die Überlappung von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beobachten, da in bis zu 20% der Fälle beide Krankheitsbilder nebeneinander existieren (Binder, 1998; Bonon, 2003a). Damit scheint es eine Überlappung bestimmter Krankheits-assoziiierter Gene beim Morbus Crohn und Colitis ulcerosa zu geben. Ein weiteres Indiz für die Vererbbarkeit einer Disposition für Morbus Crohn ist die Beobachtung, dass Familienangehörige von Morbus Crohn-Patienten, welche selbst nicht erkrankt sind, einen erhöhten Titer Crohn-assoziiierter Antikörper wie Antikörper

Epidemiologische Beweise für eine genetische Disposition

gegen *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) aufweisen. Obwohl die pathogenetische Relevanz dieser Antikörper noch nicht vollständig geklärt ist, weisen bis zu 70% der Patienten und 20-25% der erstgradigen Angehörigen einen erhöhten Titer auf (Glas, 2002; Seibold, 2001; Torok, 2005a; Vermeire, 2001). Durch diese epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass ein starker genetischer Einfluss in der Pathogenese des Morbus Crohn besteht, welcher jedoch nicht durch einen Mendelschen Erbgang charakterisiert ist, sondern vielmehr durch eine Vielzahl von Genen beeinflusst sein muss, welche in unterschiedlichem Maße an der Pathogenese beteiligt sein müssen.

Kopplungs- analysen und Assoziationsstu- dien

Multifaktorielle Erkrankungen wie Morbus Crohn, welche ein polygenes Vererbungsmuster aufweisen, sind seit einiger Zeit Gegenstand genetischer Studien. In der Zeit vor den sogenannten genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurden anhand von Kopplungsanalysen oder Assoziationsstudien mehrere potentielle Kandidatengene identifiziert und in unabhängigen Studien verifiziert. Darunter fielen Gene wie *NOD2* (Hampe, 2001; Hugot, 2001; Ogura, 2001a), *SLC22A4* und *SLC22A5* im IBD5-Locus (Peltekova, 2004; Torok, 2005b). Bei Erkrankungen mit komplexer Vererbung jedoch, wie es bei dem Morbus Crohn der Fall ist, sind familienbasierte Kopplungsanalysen für den größten Anteil der relevanten, jedoch nur schwach assoziierten Gene statistisch nicht ausreichend. Ebenso sind Assoziationsstudien von potentiellen Kandidatengenen, welche entweder zuvor durch Kopplungsanalysen eruiert wurden oder anhand von pathophysiologischen Überlegungen ausgewählt wurden, eine nicht ausreichend effektive Methode für assoziierte Genvarianten mit nur schwacher Penetranz (Hirschhorn, 2005).

Genomweite Asso- ziationsstudien (GWAS)

Nach Einführung der GWAS konnten bei Analysen von ausreichend großer Population assoziierte Genloci identifiziert werden, welche eine weniger starke Assoziation aufweisen und damit durch falsch negative Ergebnisse in den vorausgegangenen Untersuchungen übersehen wurden. Genomweite Assoziationsstudien beinhalten die Genotypisierung einer hohen Anzahl von *single nucleotide* Polymorphismen (SNPs), welche die humane genetische Variation über das gesamte Genom erfassen. Diese Studien identifizierten u.a. die Genloci *IL23R*, *ATG16L1* und *IRGM* (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007; Duerr, 2006; Hampe, 2007; Parkes, 2007; Rioux, 2007; Libioulle, 2007), welche in weiteren Studien feinkartiert werden, um das entsprechende Krankheits-assoziierte Allel zu bestimmen und möglicherweise die Pathogenese des Morbus Crohn weiter zu entschlüsseln. Eine vollständige Liste der aktuell identifizierten Suzeptibilitätsloci ist in Tab. 1-1 dargestellt (Barrett, 2008).

1.3 Zur Ätiologie des Morbus Crohn

Einige der identifizierten Morbus Crohn-assoziierten Gene können drei funktionellen Hauptwegen zugeordnet werden, welche in der Pathogenese eine Rolle spielen (s. Abbildung 1-2). Dazu gehören das angeborene Immunsystem, die Autophagie und die Regulation des IL-23-Signaltransduktionsweges.

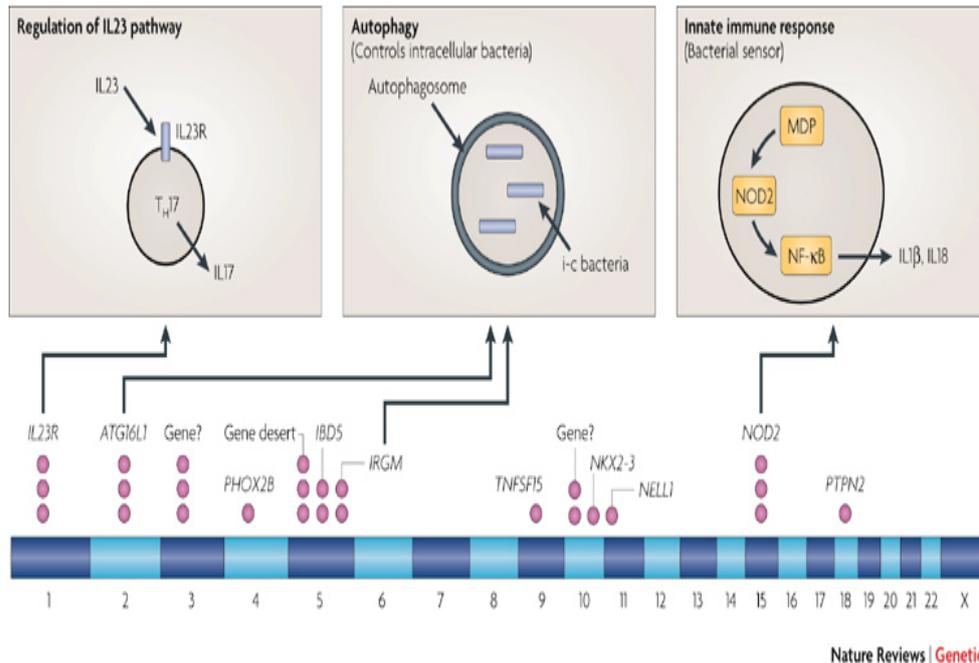


Abbildung 1-2: Durch GWAS am stärksten und am besten reproduzierte Assoziationen von chromosomalen Orten mit dem Morbus Crohn werden dargestellt. Die Anzahl der violetten Punkte korreliert dabei mit der Stärke und Reproduzierbarkeit der Daten. Drei der Hauptwege, welche in der Pathogenese des Morbus Crohn impliziert sind, werden dargestellt (nach Mathew, 2008).

SNP	Chromosom	Gen	p-Wert
rs11465804	1p31	<i>IL23R</i>	6.66×10^{-63}
rs3828309	2q37	<i>ATG16L1</i>	2.36×10^{-32}
rs3197999	3p21	<i>MST1</i>	1.15×10^{-12}
rs4613763	5p13	<i>PTGER4</i>	6.82×10^{-27}
rs2188962	5q31		2.32×10^{-18}
rs11747270	5q33	<i>IRGM</i>	3.40×10^{-16}
rs4263839	9q32	<i>TNFSF15</i>	2.60×10^{-10}
rs10995271	10q21	<i>ZNF365</i>	4.46×10^{-20}
rs11190140	10q24	<i>NKX2-3</i>	3.06×10^{-16}
rs2066847	16q12	<i>NOD2</i>	2.98×10^{-24}
rs2542151	18p11	<i>PTPN2</i>	5.10×10^{-17}

Tab. 1-1 Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn identifiziert durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn identifiziert durch die Metaanalyse dreier GWAS kombiniert mit einer Replikationsstudie. Die ersten 11 SNPs stellen schon zuvor identifizierte Loci dar und wurden bestätigt, die weiteren 19 wurden durch diese Studie neu identifiziert (modifiziert nach Barrett, 2008).

SNP	Chromosom	Gen	p-Wert
rs2476601	1p13	<i>PTPN22</i>	1.46×10^{-8}
rs2274910	1q23	<i>ITLN1</i>	1.46×10^{-9}
rs9286879	1q24		1.53×10^{-9}
rs11584383	1q32		1.43×10^{-11}
rs10045431	5q33	<i>IL12B</i>	3.86×10^{-13}
rs6908425	6p22	<i>CDKAL1</i>	8.96×10^{-10}
rs7746082	6q21		2.44×10^{-10}
rs2301436	6q27	<i>CCR6</i>	1.04×10^{-12}
rs1456893	7p12		4.60×10^{-9}
rs1551398	8q24		4.50×10^{-9}
rs10758669	9p24	<i>JAK2</i>	3.46×10^{-9}
rs17582416	10p11		1.79×10^{-9}
rs7927894	11q13	<i>C11orf30</i>	1.32×10^{-9}
rs11175593	12q12	<i>LRRK2,MUC19</i>	3.08×10^{-10}
rs3764147	13q14		2.08×10^{-13}
rs2872507	17q21	<i>ORMDL3</i>	5.00×10^{-9}
rs744166	17q21	<i>STAT3</i>	6.82×10^{-12}
rs1736135	21q21		7.40×10^{-9}
rs762421	21q22	<i>ICOSLG</i>	1.41×10^{-9}

Tab. 1-1 Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn identifiziert durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

1.3.2 Das mukosale Immunsystem

Das klinische Bild, die histopathologischen Befunde und die Effektivität einer immunsuppressiven Medikation beim Morbus Crohn sprechen für eine starke Beteiligung des Immunsystems in der Pathogenese des Morbus Crohn. Mehrere Komponenten des Immunsystems scheinen dabei beteiligt zu sein, wie luminale Antigene, intestinale Epithelzellen, Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems sowie deren sezernierte Mediatoren.

Die Mukosa des gastrointestinalen Trakts wird einer sehr großen Anzahl von Bakterien ausgesetzt. Nur eine Schicht von Epithelzellen trennt diese luminalen Bakterien von immunkompetenten Zellen des Organismus. Das angeborene Immunsystem, aber auch Eigenschaften der Epithelzellschicht tragen dazu bei, dass eine Invasion der luminalen Bakterien verhindert wird, und eine rasche Antwort auf pathogene Mikroorganismen sichergestellt ist. Jedoch wird der Darminhalt auch durch eine Vielzahl an apathogenen Antigenen von Nahrungsbestandteilen und kommensaler Flora charakterisiert. Eine ständige Aktivierung des Immunsystems mit konsekutiver Entzündung würde die Darmmukosa beträchtlich schädigen, wie es bei den CED der Fall ist. Deshalb ist eine Induktion von Toleranz gegenüber apathogenen Antigenen eine wesentliche Aufgabe des intestinalen Immunsystems.

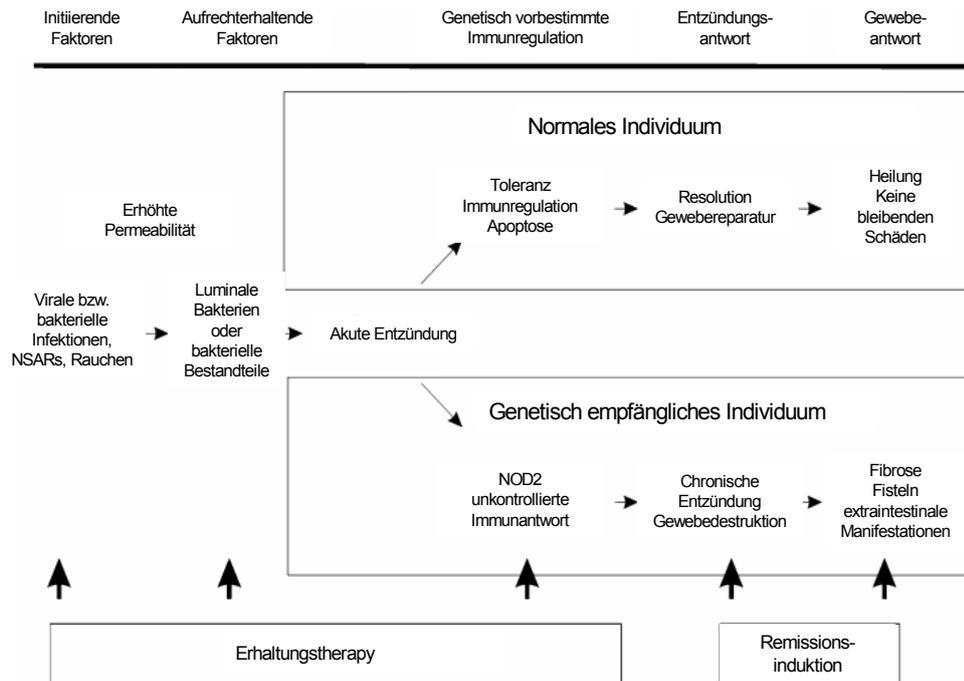
Abwehr und Toleranzinduktion

Diese "Hyporeaktivität" wird durch ein verstärkt antiinflammatorisches Zytokinprofil, verminderte Ansprechbarkeit bzw. Anergie und auch durch erhöhte Apoptoserate immunkompetenter Zellen sichergestellt (Boirivant, 1996; Braunstein, 1997). Eine Veränderung einer dieser wesentlichen Bestandteile der Toleranzinduktion könnte demzufolge in einer überschießenden Immunantwort enden und eine sich selbst erhaltende Entzündung induzieren.

Toleranzinduktion durch anti-inflammatorisches Zytokinprofil, Anergie und erhöhte Apoptoserate

Diese Fähigkeit des Darmes, wie auch anderer mukosaler Organe des Körpers, wie z.B. der Nasenschleimhaut, Toleranz gegenüber oral zugeführten Antigenen zu entwickeln, wurde in experimentellen Studien an Mäusen erfolgreich zur Therapie von Autoimmunkrankheiten eingesetzt. Hierbei spielte die genaue Dosierung eine Rolle, wobei hochdosierte Antigengabe einen anderen Mechanismus als niedrigdosierte Antigengabe darstellt. Hochdosierte Antigengabe scheint einerseits durch Vernetzung von T-Zellrezeptoren bei Abwesenheit von adäquaten Ko-Stimulatoren zu einer Anergie zu führen und andererseits durch Beteiligung von Fas und Fas-Ligand Apoptose zu induzieren. Niedrigdosierte Antigengabe scheint eine Beteiligung von Regulator-T-Zellen zu beinhalten. Hierbei wird die Antwort der Effektor-T-Zellen durch Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 und TGF- β , und auch durch Bindung inhibitorischer Rezeptoren auf der Zelloberfläche unterdrückt. Leider konnten diese Erfolg versprechenden Studien bis heute nicht oder nur unvollständig in humanen Studien umgesetzt werden. Dieser Unterschied wird durch die Ungleichheit des murinen und humanen Immunsystems erklärt, wie auch durch die größere genetische Diversität und die therapeutische Immunsuppression mancher Studienteilnehmer (s. Übersichtsartikel Mayer, 2004).

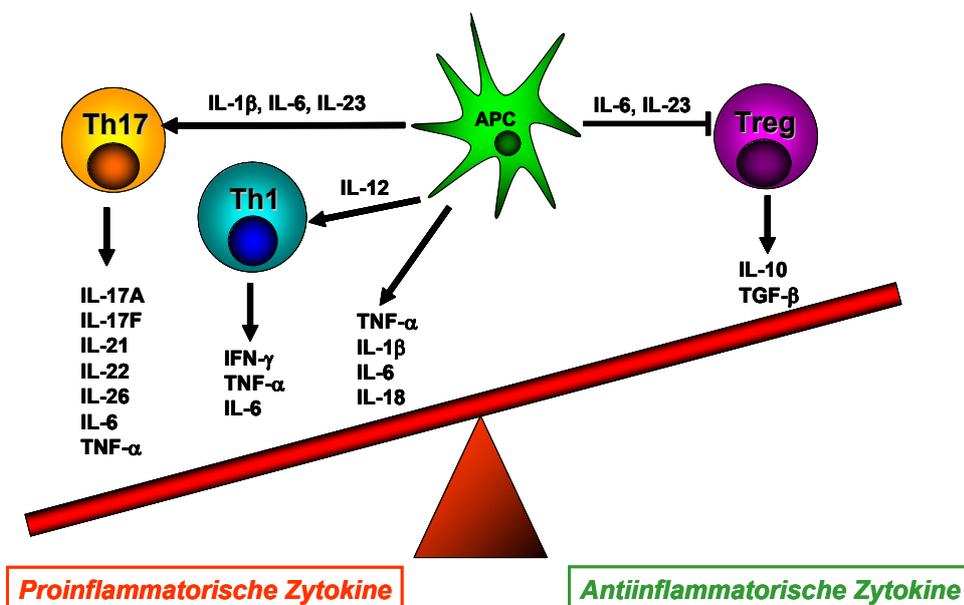
Abbildung 1-3: Initiierende Faktoren erhöhen die Permeabilität, Bakterien können in die mukosalen Kompartimente disseminieren. In normalen Individuen heilt diese leichte Entzündung subklinisch aus; Toleranz wird induziert. Die meisten Therapeutika setzen v.a. in dem späteren Stadium an, d.h. in der Dämpfung der Entzündung durch Remissionsinduktion. Günstiger wäre jedoch eine Erhaltungstherapie durch Toleranzinduktion. Dies ist Gegenstand aktueller Forschung (modifiziert nach Braat, 2006).



Th1-Dominanz und IL12

Beim Morbus Crohn führt eine erhöhte Produktion von IL-12 durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) zu einer Verschiebung zur Th1-dominierten Immunantwort (Monteleone, 1997). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α und IFN-γ gegenüber antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, welche beim Gesunden dominieren.

Abbildung 1-4: Beim Morbus Crohn besteht ein gestörtes Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. Nach Kontakt mit Mikroorganismen werden durch APCs Zytokine ausgeschüttet, welche die Differenzierung zu Th1- oder Th17-Zellen fördern oder direkt proinflammatorisch wirken. (modifiziert nach Brand, 2009)

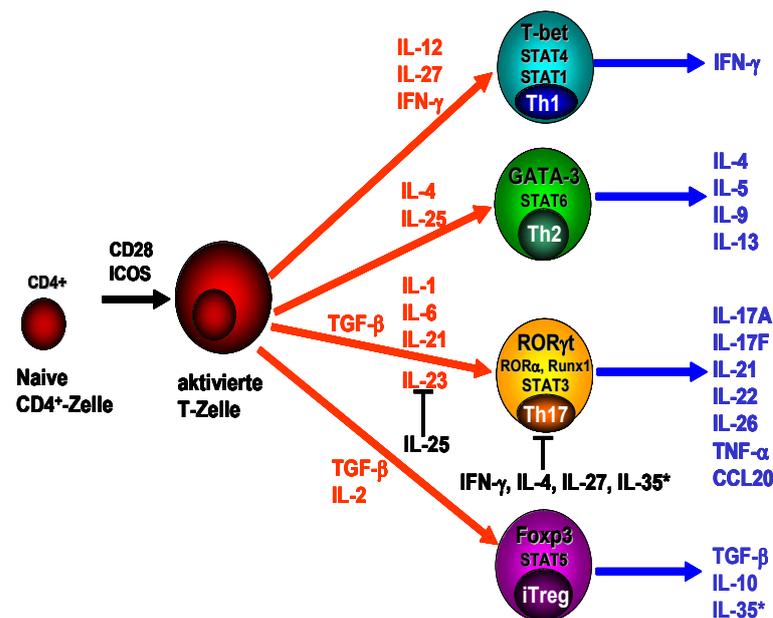


Die Bedeutung dieser IL-12-induzierten Th1-Dominanz unterstreicht eine Studie, bei der eine Th1-induzierte experimentelle Kolitis in Mäusen mit Anti-IL12-Antikörpern

zur partiellen oder vollständigen Remission gebracht werden konnte (Neurath, 1995). Auch in Studien mit Morbus Crohn-Patienten konnte nach Verabreichung von monoklonalen Antikörpern gegen IL-12p40 eine Reduktion der klinischen Symptome erreicht werden mit einer Verringerung T_H1-assoziiertes Zytokine an den Orten der Entzündung (Mannon, 2004).

Neueste genetische Studien haben ergeben, dass Morbus Crohn mit Polymorphismen im *IL23R*-Gen assoziiert sind. Von besonderem Interesse ist dabei der protektive Effekt eines seltenen Allels einer stark konservierten Aminosäureregion, p.R381Q, welcher im Vergleich zu Gesunden bei Morbus Crohn-Patienten stark unterrepräsentiert ist (Mathew, 2008). Da sich die immunregulatorischen Zytokine IL-23 und IL-12 die IL-12p40-Domäne teilen, ist damit nicht sicher geklärt, ob der therapeutische Effekt von IL-12p40-Antikörpern auf eine Wirkung gegen IL-12 oder IL-23 beruht. Eine wichtige Rolle von IL-23 in der Pathogenese des Morbus Crohn wird darin gesehen, dass es die Expression von IL-17 durch T_H17-Zellen induziert (Neurath, 2007).

Eine erhöhte Expression von IL-17 in der Lamina propria von Morbus Crohn-Patienten wurde in verschiedenen Studien gezeigt (Fujino, 2003). Die T_H17-Zelllinie wurde erst kürzlich neu beschrieben



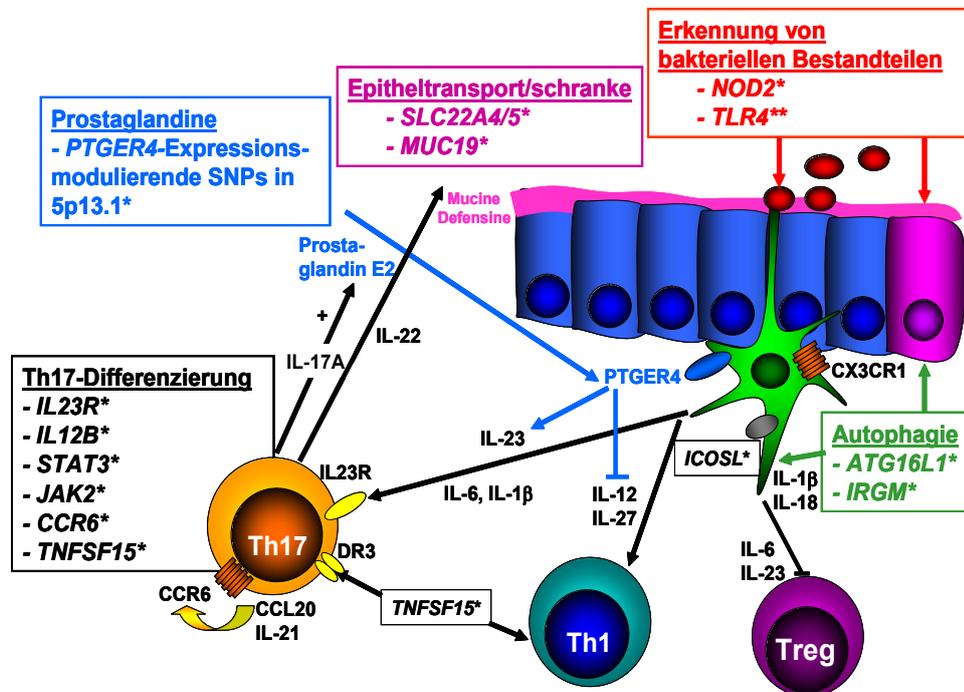
IL23 -T_H17-Achse

Abbildung 1-5: Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen zu T_H1-, T_H2-, T_H17- und iTreg-Zellen durch unterschiedliche Zytokine und Induktion von Transkriptionsfaktoren (nach Brand, 2009)

und stellt eine alternative Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen neben der T_H1- und T_H2-Differenzierung dar (s. Abbildung 1-5). Diese Differenzierung zu T_H17-Zellen wird durch die Abwesenheit von T_H1- und T_H2-Zytokinen IFN-γ und IL-4 und durch Anwesenheit von IL-23 gefördert (Harrington, 2005). T_H17-Zellen produzieren eine Reihe weiterer proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IL-17F, IL-22, IL-26 und CCL20, die verstärkt bei Morbus Crohn-Patienten in der Darmmukosa exprimiert werden (Brand, 2006; Dambacher, 2008; Seiderer, 2008). IL-23-induzierte

T_H17 -Dominanz wird in der Pathogenese von mehreren Autoimmunerkrankungen vermutet (Cua, 2003; Murphy, 2003). Mehrere der identifizierten genetischen Assoziationen beim Morbus Crohn können mit T_H17 -Zellen in Zusammenhang gebracht werden (s. Abbildung 1-6), was die pathogenetische Bedeutung dieser Subpopulation weiter unterstreicht (Brand 2009).

Abbildung 1-6: Die Hauptgruppen der Suszeptibilitätsloci beim Morbus Crohn und ihr Einfluss auf die T_H17 -Zellen. Die Erkennung von bakteriellen Bestandteilen durch APCs, die Autophagie von Bakterien, die Integrität der Epithelschranke und die Produktion von antimikrobiellen Defensinen, die Erkennung von proinflammatorischem Prostaglandin E2 und Faktoren, welche die T_H17 -Differenzierung selbst fördern, können in diesem Schema zu einer Verstärkung der schädlichen Wirkung einer T_H17 -betonten Immunantwort führen (modifiziert nach Brand 2009).



TNF- α beim Morbus Crohn

Ein weiteres sehr wichtiges Zytokin in der Pathogenese des Morbus Crohn ist TNF- α . In der intestinalen Mukosa von Morbus Crohn-Patienten wird dieses proinflammatorische Zytokin vermehrt exprimiert und eine Anti-TNF- α -Therapie (z.B. Infliximab) wird erfolgreich zur Remissionsinduktion verwendet. Diese monoklonalen Antikörper gegen TNF- α führen zu einer Reduktion der T_H1 -Antwort mit konsekutiver Reduktion der Entzündung (Plevy, 1997).

IL-1 β beim Morbus Crohn

IL-1 β gehört ebenfalls zu den proinflammatorischen Zytokinen, welche in der Pathogenese des Morbus Crohn impliziert sind. Im Serum von gesunden Individuen lässt sich selten IL-1 β detektieren, wohingegen bei Morbus Crohn-Patienten oft erhöhte Spiegel in der Darmmukosa festzustellen sind (Mahida, 1989). IL-1 β , wie auch TNF- α werden durch die Aktivierung von NF- κ B vermehrt exprimiert und stellen so ein wichtiges Bindeglied zu den intra- und extrazellulären Detektoren bakterieller

Bestandteile dar (s.unten). IL-1 β induziert die Expression von proinflammatorischen Genen wie IL-6 und induzierbare Stickstoffoxid-Synthetase (iNOS). Außerdem führt es zur erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen, welche die Infiltration von Leukozyten vom Blut ins Gewebe fördert. Injiziert man IL-1 β , so führt es als starkes Pyrogen zur Erhöhung der Körpertemperatur (Dinarello, 1996).

IL-10 ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und wird ebenfalls durch die Aktivierung von NF- κ B reguliert. Die Bedeutung beim Morbus Crohn wird v.a. durch IL-10 *knock-out* Mausmodelle deutlich, welche nach 2-3 Monaten eine spontane Kolitis mit vielen Ähnlichkeiten zu Morbus Crohn entwickeln (Kuhn, 1993). Eine Therapie mit subkutan appliziertem rekombinantem IL-10 konnte jedoch keine signifikanten Erfolge erzielen (Fedorak, 2000; Schreiber, 2000; Tilg, 2002). Erfolgversprechend in einer vorläufigen Studie zeigte sich die Therapie mit genetisch veränderten Bakterien (*Lactococcus lactis*), welche im Darm lokal IL-10 produzieren können (Braat, 2007).

IL-10 beim Morbus Crohn

Bakterien besitzen Bestandteile, welche durch besondere repetitive Muster charakterisiert sind und als *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Diese PAMPs werden durch den Organismus mithilfe von *Pattern Recognition Rezeptoren* (PRRs) erkannt. PRRs können sowohl intra- wie auch extrazellulär lokalisiert sein und führen nach Bindung von bestimmten PAMPs zu einer Aktivierung von Effektormolekülen in der Zelle. Im gastrointestinalen Trakt spielen sowohl extra-

Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs)

PRR	PAMP	Lokalisation
TLR1	Triacyl-Lipopeptide	Extrazellulär
TLR2	Bakterielle Lipoproteine	Extrazellulär
TLR3	Doppelstrang-RNA	Intrazellulär
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS)	Extrazellulär
TLR5	Bakterielles Flagellin	Extrazellulär
TLR6	Diacyl-Lipopeptide	Extrazellulär
TLR7/8	Einzelstrang-RNA (ssRNA)	Intrazellulär
TLR9	Nicht-methylierte DNA (CpG-Motive)	Intrazellulär
TLR10	Unbekannt (Human)	Unbekannt
TLR11	Uropathogene bakterielle Bestandteile (Murin)	Extrazellulär

Tab. 1-2 *Pattern Recognition-Rezeptoren (PRR) und ihre Liganden (PAMPs)*

PRR	PAMP	Lokalisation
TLR12	Unbekannt (Murin)	Unbekannt
TLR13	Unbekannt (Murin)	Unbekannt
NOD1	Lanthionin meso-diamino-pimelsäure (meso-DAP) und γ -D-Glu-meso-diamino-pimelsäure (iE-DAP)	Intrazellulär
NOD2	Muramyl-Dipeptid (MDP)	Intrazellulär

Tab. 1-2 *Pattern Recognition-Rezeptoren (PRR) und ihre Liganden (PAMPs)*

zelluläre PRRs, wie einige Mitglieder der Toll-like-Rezeptor- (TLR) Familie, als auch intrazelluläre PRRs, wie die Mitglieder der NOD-Familie und TLR-Familie, eine wichtige Rolle. Die TLRs stellen eine Gruppe von transmembranen Rezeptoren dar, welche durch eine bestimmte Grundstruktur mit drei Domänen charakterisiert sind. Diese Domänen bestehen aus einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne mit multiplen Leuzin-reichen Repeats (Wiederholungen) (LRR), einer kurzen Transmembrandomäne und einer hoch-homologen intrazellulären Toll-Interleukin-1-Domäne (TIR) (Cario, 2005). Die genaue Struktur der NOD-Proteine und deren Funktion wird in dieser Arbeit gesondert abgehandelt. TLRs werden in mehreren Zellen des gastrointestinalen Systems induzierbar oder konstitutiv exprimiert, wie intestinale Epithelzellen (Cario, 2000), Monozyten/Makrophagen (Hausmann, 2002), dendritische Zellen der Lamina propria (Hart, 2005), Myofibroblasten (Otte, 2003), Endothelzellen (Maaser, 2004) und Adipozyten der intestinalen Submukosa (Batra, 2007). Sie stellen somit ein wichtiges Erkennungssystem für bakterielle Bestandteile dar. Obwohl ihre genaue Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist, kann angenommen werden, dass bei Fehlregulation eine überschießende oder inadäquate Immunreaktion ausgelöst wird (Wald, 2003). Bei CED wurde ein im Vergleich zu Gesunden verändertes Expressionsprofil der TLRs beobachtet. So wurde in entzündlicher Mukosa von Morbus Crohn-Patienten eine vermehrte TLR4-Expression und eine verminderte TLR3-Expression festgestellt (Cario, 2000). Außerdem wurden Polymorphismen in TLR4 mit erhöhtem Risiko der Entwicklung einer CED assoziiert (Arbour, 2000; Franchimont, 2004; Torok, 2004; Brand, 2005; De Jager, 2007).

Rolle der Epithelzellen

Wie schon erwähnt spielen auch die Epithelzellen der intestinalen Mukosa eine Rolle in der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Zum einen ist durch die Epithelzellschicht und ihren Zonulae occludens und Tight junctions eine mechanische Abdichtung vorhanden, zum anderen werden von bestimmten spezialisierten Epithelzellen,

wie z.B. Paneth-Zellen, antimikrobielle Substanzen produziert, welche zur Abtötung von bestimmten Mikroorganismen führen können (Elphick, 2005; Selsted, 2005). Eine der Hauptgruppen dieser antimikrobiellen Substanzen, die Defensine, werden in unterschiedlichem Maße im gastrointestinalen Trakt sezerniert und werden auch NOD2-Genotyp-abhängig induziert (Kobayashi, 2005; Uehara, 2007; Wehkamp, 2004).

1.3.3 Umweltfaktoren

In der Pathogenese des Morbus Crohn gibt es verschiedene Belege für den Einfluss von Umweltfaktoren wie z.B. Diät und Rauchen, wobei insbesondere der Einfluss von Bakterien zu erwähnen ist.

Es gibt epidemiologische Hinweise, welche einen Anstieg der Prävalenz von Morbus Crohn im Laufe des zwanzigsten Jahrhunderts beschreiben. Dies wird unter anderem durch verbesserte Hygienebedingungen der Bevölkerung und den damit verlangsamten Kontakt mit darmpathogenen Mikroorganismen (Gent, 1994) und einem veränderten Verhältnis von potentiell pathogenen zu schützenden Darmbakterien erklärt (Tamboli, 2004). Die sogenannte *cold chain hypothesis*, also Kühlketten-Hypothese besagt, dass der Mensch in der heutigen Zeit v.a. durch die Verbreitung von Kühlschränken vermehrt in Kontakt mit Bakterien gerät, welche sich bevorzugt in niedrigen Temperaturen vermehren, wie z.B. *Listeria monocytogenes* und *Yersinia enterocolica* (Hugot, 2003). Aber nicht nur die Verschiebung der Darmflora zu Gunsten der pathogenen Organismen ist von Bedeutung, sondern auch der Verlust von schützenden Organismen. In den Erst-Welt-Ländern der heutigen Zeit sind die Menschen durch verbesserte Hygiene und auch medizinische Möglichkeiten weitgehend frei von parasitären Organismen. Diese Parasiten scheinen jedoch bezüglich CED eine protektive Wirkung zu besitzen und bieten auch eine Erklärungsmöglichkeit für das erhöhte Risiko in höheren sozioökonomischen Schichten. Mehrere Studien, welche die Induktion einer parasitären Infektion des Darms in Patienten mit CED beinhalteten, konnten positive Resultate erzielen, wobei weitere Studien benötigt werden (Croese, 2006; Summers, 2003; Summers, 2005a; Summers, 2005b). Auch der Einsatz von sogenannten Probiotika, also Nahrungsmittel angereichert mit unterschiedlichen apathogenen Mikroorganismen wie z.B. aus der Gattung *Lactobacillus* oder *Saccharomyces* wurde in Studien untersucht, es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Placebo festgestellt und kann damit nicht empfohlen werden (Rolfe, 2006).

Weiterhin ist der verbreitete Gebrauch von Antibiotika ein Faktor, welcher die

Bakterien (Mikroflora) und Morbus Crohn

Darmflora negativ beeinflusst. In mehreren Studien konnte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Morbus Crohn gezeigt werden (Card, 2004; Demling, 1994). Jedoch muss erwähnt werden, dass zur Therapie eines Schubes bei Morbus Crohn auch Antibiotika erfolgreich eingesetzt werden können.

Die klinisch pathologische Ähnlichkeit der verschiedenen Infektionen v.a. mit Anfangsstadien des Morbus Crohn trägt zur Annahme bei, dass Mikroorganismen an der Pathogenese des Morbus Crohn beteiligt sein könnten. Hervorzuheben in dieser Hinsicht sind insbesondere Infektionen mit *Campylobacter*, *Shigellen*, *Salmonellen* und *Yersinien*, welche die diagnostische Abgrenzung zum Morbus Crohn erheblich erschweren (Schumacher, 1994a; Schumacher, 1994b).

Auch experimentelle Studien lieferten Hinweise für eine Beteiligung von Bakterien an der Pathogenese des Morbus Crohn. In transgenen Tiermodellen für CED ist es möglich, die Entwicklung einer Kolitis durch Aufzucht in keimfreier Umgebung zu verhindern und nach Kontakt mit bestimmten Bakterien auszulösen (Blumberg, 1999; Elson, 1995; Jurjus, 2004; Rath, 2001). Auch beim Menschen ist der Kontakt zu Bakterien im Stuhl für die Entwicklung eines Morbus Crohn notwendig. So konnte gezeigt werden, dass nach kurativer Resektion des Ileums die Anlage eines protektiven Stomas oder eines protektiven Ventils die Rezidivrate senken konnte (Bakkevold, 2000; D'Haens, 1998; Rutgeerts, 1991), ein Effekt, welcher nach Rückverlagerung des Stomas nicht mehr zu sehen war.

Diese Daten geben starke Hinweise für eine Rolle von Mikroorganismen in der Pathogenese des Morbus Crohn. Hinsichtlich des Mechanismus werden jedoch mehrere unterschiedliche Theorien diskutiert, welche sich gegenseitig nicht unbedingt ausschließen, sondern auch als komplementär gesehen werden können.

Einzelner pathogener Erreger als Ursache des Morbus Crohn

Zunächst gibt es die Theorie eines einzelnen pathogenen Erregers, welcher noch nicht isoliert werden konnte. Als möglicher Kandidat für diese Rolle wurde lange Zeit vor allem *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* (MAP) diskutiert (Autschbach, 2005; Bull, 2003; Clarkston, 1998; Naser, 2004; Suenaga, 1999). Eine neuere Studie, in welcher MAP mit einer Antibiotikakombination behandelt wurde, konnte nach 2 Jahren keinen Unterschied in der Schubfrequenz im Vergleich zur Placebo-Gruppe zeigen (Selby, 2007). Somit scheint MAP als kausativer Erreger des Morbus Crohn eher unwahrscheinlich zu sein. Es wurden auch andere Erreger als potentielle Kandidaten untersucht (Burnham, 1978; Liu, 1995; Parent, 1976; Persson, 1979; Schuller, 1979) und momentan wird eine Assoziation des pathogenen B2+D *E.coli* Stamm mit der Entwicklung eines Morbus Crohn als möglich diskutiert (Kotlowski, 2007). Ein einzelner pathogener Erreger als Ursache des Morbus Crohn wird jedoch als sehr unwahrscheinlich angesehen und ein Verlust der

Toleranzinduktion gegenüber apathogene Mikroorganismen als eher wahrscheinlich (s. Kapitel 1.3.2).

Weiterhin wird eine erhöhte Permeabilität der Mukosa diskutiert, welche zu einer verstärkten Invasion von Bakterien führen kann. Die Frage nach der primären bzw. sekundären Form dieser Störung wird heutzutage kontrovers diskutiert. Hinweise, welche auf eine primäre, genetische Natur deuten, sind z.B. die Tatsache, dass asymptotische Verwandte von Morbus Crohn-Patienten entweder spontan oder nach Einnahme von nichtsteroidalen Antirheumatika eine gestörte Permeabilität der Mukosa aufweisen (Hilsden, 1996; Hollander, 1986). Auch in verschiedenen genetisch veränderten Mausmodellen für CED wurde in präklinischen Stadien eine Permeabilitätssteigerung der Mukosa beobachtet (Madsen, 1999; Olson, 2006).

Erhöhte Permeabilität der Mukosa

Als letztes wird noch die sogenannte Dysbiose diskutiert, also ein gestörtes Gleichgewicht zwischen potentiell protektiv versus schädlichen Bakterien (De Hertogh, 2008). Mehrere Studien konnten nachweisen, dass sich die bakterielle Mikroflora von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Individuen unterscheidet (Marteau, 2004). Dabei wurde eine eingeschränkte Vielfalt, eine erhöhte Anzahl von *Enterobacteriaceae* und eine verminderte Anzahl von *Firmicutes*, insbesondere *Clostridiae*, festgestellt. Da Bakterien des Darmtraktes Nahrungsbestandteile metabolisieren können, führt eine Veränderung der Mikroflora zu physiologisch bedeutsamen Veränderungen des Milieus. *Clostridiae* und *Bacteroides spez.* z.B. produzieren Butyrat und kurzkettige Fettsäuren, welche die bevorzugte Energiequelle des Kolonepithels darstellen (Frank, 2007).

Dysbiose

Der Einfluss von Rauchen auf CED wurde in mehreren epidemiologischen Studien untersucht, wobei für Morbus Crohn eine Risikoerhöhung zu verzeichnen war (Cosnes, 2001; Sicilia, 2001).

Rauchen und andere Umweltfaktoren

Ernährungsfaktoren wurden besonders in den 1970er Jahren als pathogenetisch relevant erachtet. Vornehmlich der vermehrte Genuss von raffinierten Ernährungsmitteln, geringere Aufnahme von Ballaststoffen und auch Einsatz von Kuhmilch zur Säuglingsernährung wurden als verantwortlich gesehen (Koletzko, 1989 #252; Riordan, 1998; Weinand, 1997). Jedoch konnte ein pathogenetischer Zusammenhang in Studien nie belegt werden und wird zunehmend als sekundär betrachtet (Reif, 1997).

Als ein weiterer möglicher Morbus Crohn-assoziiertes Faktor wurde psychosozialer

Stress angesehen, welcher bei manchen Patienten mit einer Verstärkung oder Auslösung eines neuen Schubes in Zusammenhang gebracht wurde (Duffy, 1991). In verschiedenen Studien konnte jedoch kein eindeutiger Beleg für die pathogenetische Relevanz von psychosozialen Faktoren gefunden werden (Jantschek, 1998; Schwarz, 1991).

1.4 NOD2

Entdeckung

Im Jahr 2001 wurde das *NOD2*-Gen (zwischenzeitlich auch *CARD15* genannt) auf Chromosom 16 als erstes Crohn-assoziiertes Gen von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen identifiziert (Ogura, 2001a; Hugot, 2001). Obwohl aus epidemiologischen Studien schon lange bekannt war, dass eine genetische Disposition bei der Pathogenese des Morbus Crohn eine Rolle spielt, stellte dies die erste Identifizierung eines krankheitsrelevanten Gens dar.

Struktur

NOD2 gehört der Gruppe der NLR-Proteine an. Alternative Namen für diese Gruppe sind auch NOD-LRR- und CATERPILLAR-Proteine (Wilmanski, 2008; Ting, 2005; Inohara, 2005), Namen, welche von unterschiedlichen Autoren gegeben wurden und zum Teil unterschiedliche Proteine in die Klassifizierung mit einbeziehen. Die Struktur der NLR-Proteine enthält drei Domänen. Zum einen die zentrale *nucleotide-Binding-Domäne* (NBD) und zum anderen die C-terminale leuzinreiche Domäne, welche auch *ligand-recognition-Domäne* bezeichnet wird. Die N-terminale Domäne ist variabel, stellt eine *effector-binding-Domäne* dar, führt zu Protein-Protein-Interaktionen und beinhaltet im Falle von *NOD2* zwei *caspase activation and recruitment-Domänen* (CARD) (Ting, 2005).

Abbildung 1-7: Struktur des *NOD2*-Proteins mit Lokalisation der drei Hauptmutationen, die mit Morbus Crohn assoziiert sind

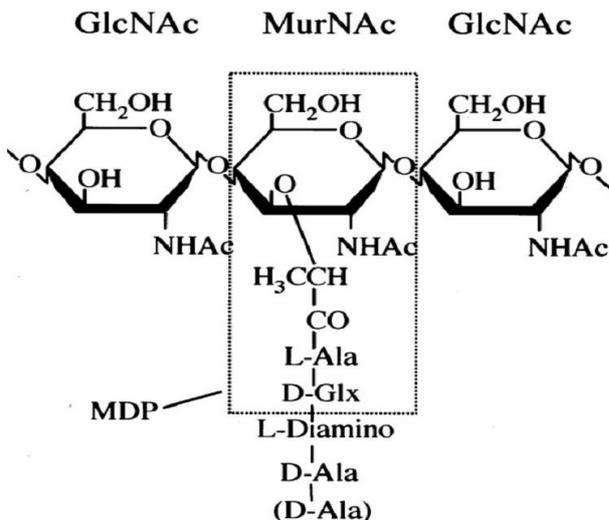


NOD2 wird konstitutiv oder induzierbar vor allem in Monozyten und Makrophagen (Ogura, 2001b), aber auch in Granulozyten, dendritischen Zellen (Gutierrez, 2002) und intestinalen Epithelzellen, wie z.B. Panethzellen exprimiert (Lala, 2003).

In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass NOD2 als intrazellulärer Rezeptor für bakterielle Bestandteile fungiert (Ogura, 2001a). Dabei wurde Muramyl-Dipeptid (MDP) als kleinster Bestandteil bakteriellen Peptidoglykans identifiziert, welcher von NOD2 spezifisch erkannt wird (Girardin, 2003; Inohara, 2003). MDP ist ein stark konserviertes Motiv, welches in der Zellwand einer Vielzahl gram-negativer und gram-positiver Bakterien zu finden ist (Hasegawa, 2006).

Funktion

Abbildung 1-8: Struktur von Muramyl-Dipeptid (MDP)



Es wird vermutet, dass die Erkennung von MDP durch NOD2 über die LRR-Domäne vermittelt wird. Jedoch konnte bis heute eine Bindung von MDP an diese Domäne nicht nachgewiesen werden. Ebenso ist nicht genau bekannt, auf welchem Weg MDP in die Zelle hineingelangt. Allein für Epithelzellen des Dünndarms wurde ein H⁺/Peptid-Kotransporter hPepT1 beschrieben, welcher im Falle einer Entzündung auch im Kolon zu finden ist und MDP in das Zellinnere transportieren kann (Vavricka, 2004).

Nach Stimulation von NOD2 mit MDP kommt es zunächst zu einer Homodimerisierung der CARD-Domänen und konsekutiv über RIP2-Kinasen zu einer Aktivierung von NF-κB und damit zu erhöhter Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-1β und IL-12. Diese Kaskade stellt somit eine zur TLR-induzierten MyD88-vermittelten Kaskade alternative Aktivierung von NF-κB dar.

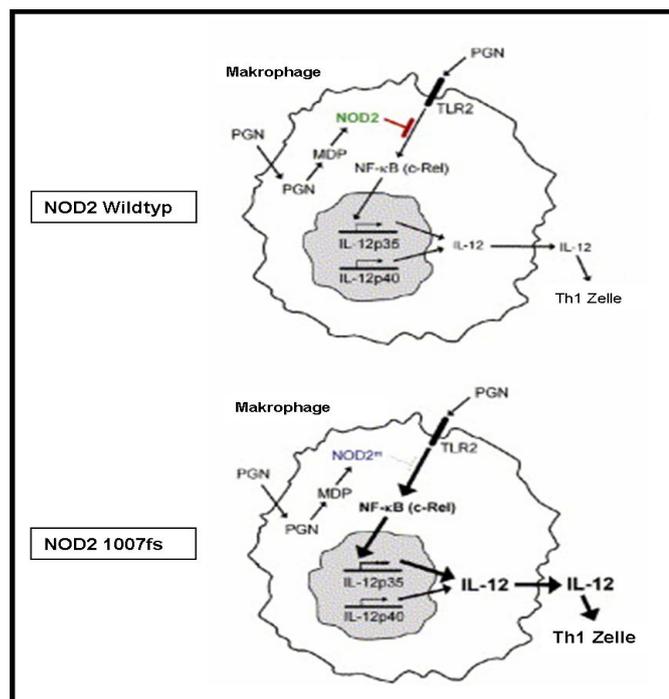
Drei Hauptvarianten des *NOD2*-Gens werden mit einer erhöhten Suszeptibilität von Morbus Crohn in Zusammenhang gebracht. Diese Mutationen, die Frameshift-Mutation 1007fs und die zwei Missense Mutationen R702W und G908R, befinden sich in dem für die LRR-Domäne kodierenden Bereich (Hugot, 2001). In Studien konnte gezeigt werden, dass NOD2-Proteine der 1007fs-Variante nach Stimulation mit MDP

Pathogenetische Relevanz

keine Aktivierung und NOD2-Proteine der anderen beiden Varianten eine abgeschwächte Aktivierung von NF- κ B im Vergleich zum Wildtyp NOD2-Protein zeigten (Ogura, 2001a). Da Morbus Crohn durch eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokinen charakterisiert ist, lag bisher die Vermutung nahe, dass eine genetische Mutation, welche mit Crohn assoziiert ist, zu einer erhöhten Freisetzung dieser Zytokine führt. Jedoch konnte in mehreren Studien an humanen mononukleären Zellen gezeigt werden, dass es durch diesen Verlust der Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit MDP zu einer verringerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt (Li, 2004; Netea, 2005a; van Heel, 2005). Dies bildete die Grundlage für die *loss of function*-Hypothese, welche postuliert, dass es durch die abgeschwächte Immunreaktion zu einer Invasion von Bakterien in die Mukosa kommen kann, welche dort eine überschießende Immunantwort auslösen.

Weitere Studien in murinen Modellen konnten zeigen, dass NOD2 als ein Regulator der TLR2-induzierten Immunantwort fungiert und transgene Mäuse, welche eine der 1007fs-NOD2-Variante entsprechende Mutation im *NOD2*-Gen tragen, eine erhöhte Freisetzung von IL-12 nach Stimulation mit PGN zeigen.

Abbildung 1-9: IL-12-Dysregulation durch NOD2-Mutationen (modifiziert nach Eckmann 2004)



Zusätzlich konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass Makrophagen mit einem 1007fs-äquivalenten *NOD2*-Genotyp eine erhöhte Freisetzung von IL-1 β nach Stimulation mit MDP im Vergleich zu Makrophagen mit einem WT-*NOD2*-Genotyp aufweisen (Maeda, 2005). Diese Beobachtungen waren der Anlass für eine kontroverse Diskussion der *loss of function* Hypothese und brachte eine weitere Hypothese, die der *gain of function* zur Diskussion. Da diese Beobachtungen jedoch nur

in murinen Modellen zu sehen waren, ist eine Übertragung dieser Theorie auf den Menschen noch in Studien nachzuweisen.

Eine weitere Theorie zur Rolle des NOD2-Proteins in der Pathogenese des Morbus Crohn besteht darin, dass die mukosale Abwehr von pathogenen Mikroorganismen gestört ist. Es konnte gezeigt werden, dass NOD2 die Expression von Defensinen in spezialisierten Zellen des Dünndarms induzieren kann und beim Vorliegen von Mutationen im *NOD2*-Gen eine geringere Konzentration dieser Defensine im terminalen Ileum zu messen ist (Wehkamp, 2008). In Konkordanz mit diesen Daten stehen klinische Studien, welche zeigen konnten, dass das Vorhandensein einer NOD2-Mutation vor allem mit einem Befall des terminalen Ileums assoziiert ist (Torok, 2003).

NOD2 ist strukturell dem Apoptose-Regulator Apaf-1 ähnlich, sie besitzen beide NOD-Domänen und mindestens eine CARD-Domäne. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch NOD2 eine Rolle in der Regulation der Apoptose spielen könnte. Überexpression von NOD2 bei simultaner Expression von Caspase-9 führt zur erhöhten Induktion von Apoptose (Ogura, 2001b). Jedoch führt die Aktivierung von NOD2 durch MDP auch zu einer erhöhten Aktivierung von NF- κ B, welches die Expression anti-apoptotischer Proteine induziert. Physiologisch könnte deshalb eine pro-apoptotische Wirkung durch Induktion von NF- κ B antagonisiert werden. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass in humanen dendritischen Zellen nach MDP-Stimulation die Expression von Proteinen der Apoptoseregulation erhöht ist. Bei dendritischen Zellen mit Wildtyp-NOD2 überwiegt die Expression apoptose-induzierender Faktoren, in Zellen von Morbus Crohn-Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen jedoch überwiegt die Induktion anti-apoptotischer Faktoren (Zelinkova, 2008). Da beim Morbus Crohn eine gestörte Apoptose vorliegt (Boirivant, 1999), stellt dies eine weitere mögliche Verbindung zu der pathogenetischen Relevanz der NOD2-Mutationen beim Morbus Crohn dar.

Rolle in der Apoptose

1.5 Apoptose

1.5.1 Apoptose

Apoptose, welches wörtlich „Fallen der Blätter“ (*apo* = von *ptosis* = fallen) bedeutet, ist eine stark kontrollierte und in ihrem Ablauf genauestens koordinierte Form des Zelltodes.

Apoptose spielt eine wichtige Rolle in diversen physiologischen Abläufen, so in Aufbau und Zellhomöostase von Geweben, als Ausgleich zur Mitose, in der

Entwicklung des Gehirns und vor allem auch in der Selektion und Elimination potentiell schädlicher Zellen des Immunsystems (Vaux, 1999). In der Embryologie ist als Beispiel die Entwicklung der Finger hervorzuheben.

Eine strenge Regulation ist bei der Apoptose essentiell. Eine Dysregulation kann bei erhöhter Apoptoserate zu degenerativen Erkrankungen, bei erniedrigter Apoptoserate zu Karzinomen oder auch Autoimmunerkrankungen führen (Thompson, 1995).

Historisches

Der Begriff Apoptose ist zurückzuführen auf Kerr et al, welcher 1972 in einer Veröffentlichung einen morphologisch distinguierbaren, mit normalen physiologischen Zellvorgängen assoziierten Zelltod beschrieb (Kerr, 1972). Obwohl schon seit 150 Jahren bekannt ist, dass Zellen in der Entwicklung unter normalen Bedingungen sterben, wurde das Thema erst wieder 1951 von Glucksmann aufgegriffen. Bis in die späten 80er Jahre blieb das Thema weitgehend unerforscht, es wurden nur wenige Daten publiziert. Zu Beginn waren die meisten dieser Daten beschränkt auf die Beschreibung der Morphologie. Selbst nach Definition des Begriffs Apoptose in 1972 blieb das Interesse weitgehend gering. Das heute sehr große Interesse an der Apoptose begann 1988 mit der Entdeckung von Bcl-2, des ersten Proteins, welches in dem biochemischen Prozess involviert ist (Vaux, 2002).

Unterschiede zur Nekrose

Apoptose ist in der Funktion, in dem Prozess und auch in der Morphologie von der Nekrose zu unterscheiden. Nekrose ist ein Ablauf, der auf akuten traumatischen Schaden von Zellen zurückzuführen ist und physiologisch nicht in einer einzigen Zelle abläuft, sondern in einem Zellsystem. Einige spezifische Unterschiede sind in Tabelle 1-3 hervorgehoben.

Apoptose	Nekrose
Interne/externe Signale	Ischämie/Toxine/Strahlung
Energieabhängig	Energieunabhängig
Einzelne Zellen	Zellgruppen
Die Zelle schrumpft und wird von Makrophagen oder benachbarten Zellen phagozytiert	Die Zelle schwillt an und gibt ihren Inhalt an die Umgebung und die Zirkulation ab
Keine Entzündungsreaktion	Merkliche Entzündungsreaktion

Tab. 1-3 Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose (Vermees, 1994)

Die charakteristischen morphologischen Grundzüge der Apoptose wurden schon **Morphologie** sehr früh beschrieben. Eine apoptotische Zelle erhält eine runde Form, verliert den Kontakt zu den benachbarten Zellen und das Zytoplasma verliert an Volumen. Es beginnt der Abbau und die Kondensation des Chromatins, bis schließlich das Chromatin in kompakten Flecken kondensiert ist (Pyknose). Die Kernhülle wird unterbrochen und der Nukleus fragmentiert zu einzelnen *chromatin bodies*. Das sogenannte *blebbing* der Zellmembran beginnt, die Zelle zerbricht in viele kleine Vesikel (*apoptotic bodies*), welche schließlich von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden (Schwartzman, 1993).

Apoptotische Zellen präsentieren ihrer Umgebung Signale zur Phagozytose, **Phagozytosesignal** sogenannte „eat me“-Zeichen. Eines dieser Signale stellt die Assymetrie der Phosphatidylserinverteilung in der Membran dar. Vitale Zellen enthalten Phosphatidylserin (PS) nur in der Innenmembran, welches sehr früh in der Apoptose auch in der Außenmembran zu finden ist. Zellen, welche zur Phagozytose befähigt sind, wie zum Beispiel Makrophagen, besitzen Rezeptoren für dieses Molekül und werden durch Bindung von Phosphatidylserin an diese Rezeptoren zur Phagozytose stimuliert (Fadok, 1992).

Der Ablauf der Apoptose ist äußerst komplex und involviert viele verschiedene **Caspasen, Adaptorproteine** Transduktionssysteme und Kaskaden. Einen wichtigen Teil der ausführenden Moleküle bilden eine Gruppe von Cystein-Proteasen, die Caspasen. Caspasen (**Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteasen**) schneiden Zielproteine C-terminal zu Aspartatresten. Die Substratspezifität der einzelnen Caspasen ist durch vier Reste N-terminal der Schneidestelle des Zielproteins bestimmt (Thornberry, 1997). Caspasen sind eine Gruppe hochkonservierter Proteine und sind deshalb vom Menschen bis hin zu Insekten, Nematoden und Hydra zu finden. In vitalen Zellen werden sie als Zymogene mit sehr geringer intrinsischer Aktivität gespeichert. Bis heute wurden in Mammalia 14 Caspasen identifiziert, welche in drei Gruppen unterteilbar sind (s.Tabelle 1-4).

Initiator-Caspasen	Caspasen -2, -8, -9, -10
Effektor-Caspasen	Caspasen -3, -6, -7
Caspasen involviert in Zytokinreifung	Caspasen -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14

Tab. 1-4 Einteilung der Caspasen nach ihrer Hauptfunktion (modifiziert nach Strasser, 2000)

Initiator- versus Effektor-Caspasen

Initiator-Caspasen enthalten lange Prodomänen mit bestimmten Interaktionsdomänen (*CARD caspase recruitment domain* oder *DED death effector domain*), welche Interaktionen mit homologen Domänen von Adapterproteinen eingehen. Diese Adaptorproteine stellen eine Verbindung zwischen den verschiedenen Apoptoseinitiatoren und Apoptoseeffektoren dar, also zwischen Caspasen und Todesrezeptoren oder auch zwischen verschiedenen Caspasen. Effektor-Caspasen hingegen besitzen nur kurze Prodomänen, weshalb sich ihre Aktivierung von den Initiator-Caspasen unterscheidet (Degterev, 2003; Fuentes-Prior, 2004).

Caspase-8 wird aktiviert, wenn ihre DED-Domäne an die C-terminalen DED-Domäne des Adaptorproteins FADD (Fas-associated Death Domain) bindet (Boldin, 1996). Aktivierung von Caspase-9 wird durch Bindung ihrer CARD-Domäne an die CARD-Domäne von Apaf-1 initiiert (Hofmann, 1997). Die Aktivierung von Initiator-Caspasen kommt im Gegensatz zu den Effektor-Caspasen nicht durch Spaltung, sondern durch Dimerisierung zustande. Es wird vermutet, dass sie einerseits durch Adaptorprotein-vermittelter Aggregation und konsekutiver Autolyse (Caspase -8 und -10) oder andererseits durch Integration in ein Holoenzym (Apoptosom, Caspase -9) aktiviert werden (Boatright, 2003; Donepudi, 2003; Stennicke, 1999). Nach Aktivierung spalten Initiator-Caspasen Effektor-Caspasen, aktivieren diese damit und induzieren eine Kaskade. Effektor-Caspasen aktivieren weitere Caspasen und führen schließlich durch Spaltung von bestimmten Zielproteinen zum Zelltod. Zytoskelettale Proteine wie Fodrin und Gelsolin sind Zielproteine, deren Abbau zum vollständigen Verlust der Zellform führt (Martin, 1995; Kothakota, 1997). Weiterhin wird PAK2 aktiviert, welches zu der p21-aktivierten-Kinase-Familie gehört und dessen Aktivität zu dem Membran *blebbing* führt (Rudel, 1997). Eine ATP-abhängige Flippase wird deaktiviert, welche im Normalzustand Phosphatidylserin auf der inneren Seite der Zellmembran hält. Dies führt zu dem oben angesprochenen Phagozytosesignal des sich auf der Außenseite der Zellmembran befindenden Phosphatidylserins (Dolis, 1997; Fadok, 1992). Die inhibitorische Untereinheit der Caspase-aktivierten-DNase (ICAD) liegt in vitalen Zellen als Komplex mit der Caspase-aktivierten-DNase (CAD) vor und wird dadurch inhibiert. Aktivierte Caspase-3 spaltet ICAD und gibt damit CAD frei. Dies führt zu einem internucleosomalen Abbau der DNA, welches nach DNA-Extraktion und Auftrennung in einem Agarosegel zu dem charakteristischen Bild des *DNA-ladderig* führt (Nagata, 2000).

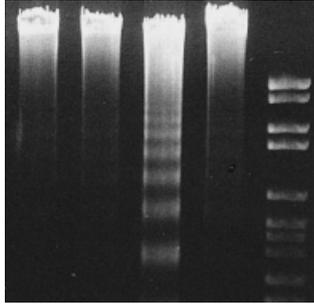


Abbildung 1-10: DNA-laddering nach Agarosegelelektrophorese

Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP; DNA-Reparaturenzym) wird von Caspasen gehemmt, infolgedessen können durch CAD und andere Nukleasen hervorgerufene Strangbrüche nicht mehr repariert werden.

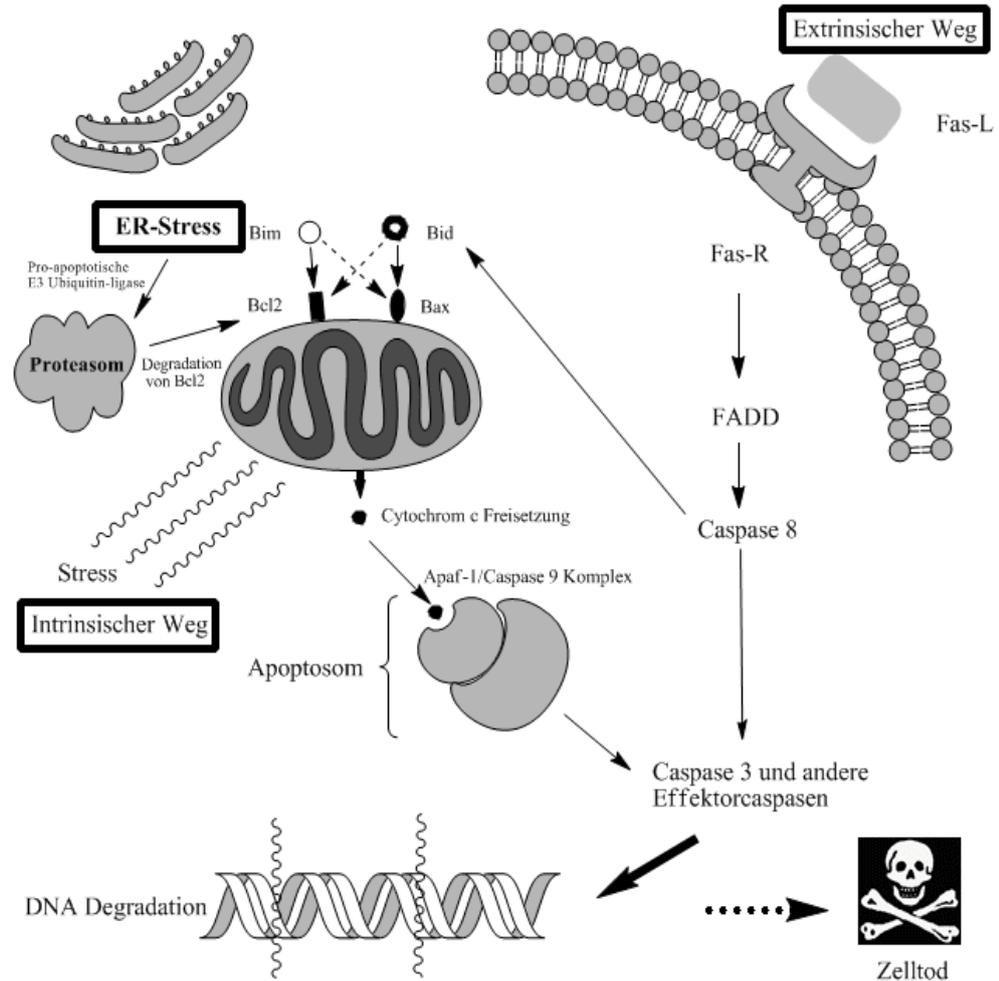
Caspasen können von IAPs (Inhibitors of apoptosis) gehemmt werden (Deveraux, 1999). Diese Inhibitoren enthalten eine unterschiedliche Anzahl an BIR- (*baculovirus inhibitory repeat*) Domänen, welche an die Caspasen binden können und damit diese Enzyme hemmen. Besonders wichtig ist dies, da Zymogene von Caspasen eine geringe intrinsische Aktivität aufweisen und es somit zu zufällig aktivierten Caspasen kommen kann. Je mehr BIR-Domänen ein Protein dieser Gruppe enthält, desto stärker ist die Inhibition (Miller, 1999 #269).

Regulation von Caspasen

In Säugetieren können grundsätzlich drei Wege der Apoptose unterschieden werden. Der intrinsische (mitochondrielle) Weg, der extrinsische (Rezeptor-vermittelte) Weg und der durch Stress des endoplasmatischen Retikulums induzierte Weg. Diese Wege kommunizieren auf vielen Stufen miteinander und konvergieren letztendlich auf der Stufe der Aktivierung der Effektor-Caspasen. (Übersichtsartikel in Danial, 2004; Lawen, 2003; Strasser, 2000)

Involvierte Signalwege

Abbildung 1-11: Übersicht der involvierten Signalkaskaden (modifiziert nach Ranger, 2001)



Intrinsischer Weg

Der intrinsische Weg wird durch verschiedene Formen des Stresses ausgelöst, zum Beispiel durch Entzug von Wachstumsfaktoren und intrazellulären Schaden. Den Mitochondrien wird hierbei die zentrale Rolle zugesprochen. Sobald ein kritisches Ereignis stattfindet, werden apoptogene Faktoren aus dem Intermembranspalt der Mitochondrien freigelassen, vornehmlich Cytochrom c. Das freigelassene Cytochrom c bindet an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) und induziert damit eine Konformitätsänderung des Apaf-1. Dieses bindet nun an Pro-Caspase-9, bildet ATP-abhängig das sogenannte Apoptosom und aktiviert damit Caspase-9 (Liu, 1996).

Die Regulation des intrinsischen Weges geschieht auf genetischer Ebene vor allem durch Mitglieder der Bcl2-Protein-Familie. Gemeinsam ist diesen Proteinen 1-4 kurze BCL2-Homologie-Domänen (BH1-BH4). Es gehören proapoptische (z.B. Bax) wie auch antiapoptische Proteine (z.B. Bcl2) zu dieser Bcl2-Familie und deren Gleichgewicht bestimmt, ob eine Zelle apoptotisch wird oder nicht. Dieses Gleichgewicht kann durch Induktion oder Repression der Expression reguliert werden. Außerdem können Proteine, welche nur BH3 enthalten, durch Phosphory-

lierung und durch Assoziation mit anderen Proteinen oder durch Spaltung aktiviert werden (Adams, 1998).

Der extrinsische Weg wird durch externe Stimuli außerhalb der Zelle induziert, wie zum Beispiel durch Bindung von „Todesliganden“ wie Fas-Ligand oder TRAIL an ihren Rezeptoren. Todesrezeptoren gehören zu der TNF- (Tumornekrosefaktor) Familie und können auf Expressionsebene hoch- oder herunterreguliert werden. Sie transduzieren externe Apoptosestimuli durch die Membran und können mittels Adaptorproteine durch homotypische Interaktionen ihrer zytoplasmatischen Domäne Initiator-Caspasen aktivieren. Ein Beispiel für diesen Weg ist die Bindung von membranständigem Fas-Ligand auf zytotoxischen T-Zellen an den Fas-Rezeptor von virusbefallenen körpereigenen Zellen. Reguliert wird der extrinsische Weg auf mehreren Ebenen. Die Rezeptoren können hoch oder runterreguliert werden und es können Rezeptoren exprimiert werden, welche den Todesliganden binden können, aber das Apoptosesignal nicht weiterleiten können und somit den Liganden wegfangen. Schließlich kann noch FLIP (FLICE(caspase-8)-like inhibitory protein) exprimiert werden, welches strukturell Caspase-8 ähnelt, jedoch keine enzymatische Fähigkeit besitzt (Ashkenazi, 2002).

Extrinsischer Weg

Das endoplasmatische Retikulum gewinnt immer mehr an Bedeutung als zweites Kompartiment, welches Stress-induzierte Apoptose einleiten kann. Ist das endoplasmatische Retikulum Stress ausgesetzt, wie gestörte Glykosylation, missgefaltete Proteine, gestörte Kalziumhomöostase und Glucoseentzug, so wird die sogenannte *unfolded protein response* (UPR) provoziert, welche die Expression von zusätzlichen Chaperonen induziert und somit das Zellüberleben sichert. Ist dieser Stress jedoch zu schwerwiegend oder kann das Gleichgewicht nicht innerhalb einer bestimmten Zeit wieder hergestellt werden, so wird Apoptose durch UPR initiiert (Breckenridge, 2003). ER-Stress-vermittelte Apoptose scheint auch im Zusammenhang mit der Pathogenese des Morbus Crohn eine gewisse Relevanz aufzuweisen (s.u.).

ER-Stress induzierter Weg

1.5.2 Apoptose und Morbus Crohn

Der Darm eines jeden Menschen ist von ca. 2×10^{14} Bakterien besiedelt, eine große Herausforderung für das Immunsystem. Stets muss ein Gleichgewicht zwischen adäquater Reaktion auf eingedrungene Mikroorganismen und Toleranz gegenüber kommensaler Flora gehalten werden. Ist dieses Gleichgewicht im Sinne einer überschießenden Reaktion gegen apathogene Mikroorganismen verschoben, so kann

daraus eine CED resultieren. Mechanismen der peripheren T-Lymphozyten-Toleranz bestehen in Anergie, Zytokin-induzierter Abschwächung der Aktivität, und Aktivitäts-induziertem programmiertem Zelltod (Apoptose) (Van Parijs, 1998). Der genaue Grund für die Überreaktivität der mukosalen Immunzellen im Falle einer CED ist bis heute nicht vollständig geklärt. Auch die Wirkweise heutiger Medikamente ist teilweise nach wie vor nicht vollständig geklärt. Jedoch wurden viele Autoimmunerkrankungen wie auch Morbus Crohn in Zusammenhang mit unzureichender Apoptose aktivierter Immunzellen gebracht. Doering et al konnten in peripheren wie auch in T-Lymphozyten der Lamina propria von Morbus Crohn-Patienten eine im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant niedrigere Apoptoserate nach Fas-Ligand-Stimulation feststellen (Doering, 2004).

Azathioprin, Sulphasalazin und Infliximab induzieren Apoptose immunkompetenter Zellen

Mehrere neuere Studien, welche sich mit der Wirkungsweise von Morbus Crohn-Therapeutika, wie Infliximab, Sulphasalazin und Azathioprin, auf zellulärer Ebene befassten, konnten unabhängig voneinander eine beschleunigte Apoptose involvierter Immunzellen feststellen (Doering, 2004; Lugerling, 2001; ten Hove, 2002; Tiede, 2003). Der pro-apoptotische Effekt von Sulphasalazin war dabei auf eine verminderte Expression von antiapoptotischen Proteinen Bcl-xl und Bcl2 zurückzuführen und nicht auf Rezeptor-vermittelter Apoptoseregulation. Dies deutet darauf hin, dass beim Morbus Crohn der intrinsische Apoptoseweg beeinträchtigt sein könnte, im Kontrast zur Colitis ulcerosa, welche aufgrund erhöhter Expression von FLIP, dem Caspase-8-Inhibitor, eine erniedrigte Apoptoserate von T-Lymphozyten aufweist (Peppelenbosch, 2004).

Weiterhin wurde für T-Lymphozyten von Morbus Crohn-Patienten ein beschleunigter Zellzyklus festgestellt, eine von anderen Autoimmunerkrankungen abweichende Abnormalität (Sturm, 2004).

Dysregulation der Apoptose bzw. eine mangelnde Induzierbarkeit von Apoptose aktivierter immunkompetenter Zellen der Darmmukosa scheint pathogenetisch relevant beim Morbus Crohn zu sein. Folglich könnte eine mögliche pathogenetische Verbindung von Morbus Crohn-assoziierten Mutationen in einer Erhöhung der Apoptoseresistenz dieser Zellen bestehen. Jedoch konnte im Zusammenhang mit ER-Stress auch eine erhöhte Apoptoserate spezialisierter Epithelzellen, wie Paneth-Zellen, bei Morbus Crohn Patienten gezeigt werden. SNPs im Transkriptionsfaktor XBP-1, ein Bestandteil der ER-Stress Antwort, zeigten eine erhöhte Assoziation mit Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Ein XBP-1 *knock-out* Mausmodell zeigte eine erhöhte Apoptoserate von Panethzellen, spontane Enteritis und erhöhte Suszeptibilität für eine DSS-induzierte Kolitis (Kaser, 2008).

Apoptoseregulation auf mehreren Ebenen scheint somit eine große Rolle in der

Pathogenese des Morbus Crohn zu spielen und NOD2 auch aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Apoptoseregulatoren möglicherweise ein Kandidat für eine solche Dysregulation mit Krankheitsrelevanz.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Identifikation der ersten Morbus Crohn-assoziierten Genmutation konnte als Durchbruch in der Erforschung der genetischen Disposition des Morbus Crohn gesehen werden. Durch Untersuchungen am Genprodukt des identifizierten Gens *NOD2* (*CARD15*) hoffte man die Pathogenese des Morbus Crohn weiter aufschlüsseln oder gar klären zu können. Leider ist dies bis jetzt nur zum Teil gelungen, da heute, acht Jahre nach Identifikation, trotz intensivster Forschung auf diesem Gebiet die genaue Rolle der NOD2-Mutationen in der Pathogenese des Morbus Crohn nicht vollständig geklärt ist. Im Gegenteil, es bestehen kontroverse Diskussionen über die physiologische Rolle des NOD2.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Rolle der NOD2-Mutationen in der Pathogenese des Morbus Crohn weiter zu entschlüsseln und möglicherweise eine der existierenden Hypothesen zu verifizieren.

Dafür wurden folgende Fragestellungen definiert:

- 1) Ist die Zytokinproduktion von Monozyten nach Stimulation mit dem spezifischen NOD2-Stimulus Muramyl-Dipeptid (MDP) gestört bei Vorhandensein von NOD2-Mutationen?

NOD2-Mutations-abhängige Zytokinprofile immunkompetenter Zellen wurden schon in mehreren Studien untersucht. Dabei wurden v.a. im Vergleich von Ergebnissen in humanen versus murinen Modellen kontroverse Unterschiede festgestellt. In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst in einem humanen ex vivo System die bestehenden Daten bestätigt bzw. gegebenenfalls widerlegt werden.

- a) Die Produktion von TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-12p40 durch humane Monozyten aus dem peripherem Blut nach Stimulation mit MDP in Abhängigkeit vom *NOD2*-Genotyp wird untersucht
- b) Die Rolle der 1007fs-*NOD2*-Mutation versus der beiden anderen *NOD2*-Mutationen R702W und G908R wird untersucht.

- 2) Besitzt NOD2 eine Rolle in der Apoptoseregulation?

Obwohl NOD2 strukturelle Ähnlichkeit mit Proteinen der Apoptoseregula-

tion aufweist und zudem Apoptoseresistenz immunkompetenter Zellen als wichtiger Faktor in der Pathogenese des Morbus Crohn gesehen wird, gibt es keine Daten über eine Funktion von NOD2 in der Apoptoseregulation.

- a) MDP wird hinsichtlich der Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in humanen Monozyten aus dem peripheren Blut untersucht.
- b) Bei Nachweis einer Apoptoseinduktion durch MDP wird die Abhängigkeit vom *NOD2*-Genotyp untersucht. Die Apoptose von Monozyten 1007fs-homozygoter Individuen nach Stimulation mit MDP wird verglichen mit Monozyten von *NOD2*-Wildtyp-Individuen.
- c) Stimulation auch anderer immunkompetenter Zellen mit MDP wird auf Induktion von Apoptose untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Labormaterial und Geräte

Gerät	Bezugsquelle
FACSCalibur	<i>BD Bioscience, San Jose, USA</i>
Midi MACS-Magneten	<i>Miltenyi Biotec, Auburn, USA</i>
MACS Stand multi	<i>Miltenyi Biotec, Auburn, USA</i>
Gefrierschrank -20C	<i>BOSCH, Stuttgart, Deutschland</i>
Kühlschrank +4C	<i>AEG, Frankfurt, Deutschland</i>
Vortexer	<i>Scientific Industries, Bohemia, USA</i>
Lichtmikroskop	<i>Olympus, Tokyo, Japan</i>
Hämozytometer, Neubauer-Zählkammer	<i>Karl Hecht, Sondheim, Deutschland</i>
Zentrifuge groß (Rotixa KS)	<i>Hettich, Tuttlingen, Deutschland</i>
Zentrifuge klein (Universal 30 RF)	<i>Hettich, Tuttlingen, Deutschland</i>
Mikrozentrifuge Modell SD und AL	<i>Roth, Karlsruhe, Deutschland</i>
Laminar Air flow HERA safe	<i>Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland</i>
Absaugpumpe	<i>Watson Marlow, Falmouth Cornwall, England</i>
Varioskan	<i>Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland</i>
MP-4 Land Camera	<i>Polaroid, Concord, USA</i>
Elektrophoresekammer Sub-cell GT	<i>BioRad, Hercules, USA</i>
Spannungsquelle Power Pac 300	<i>BioRad, Hercules, USA</i>

Tab. 2-1 Geräte

2.1 Labormaterial und Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Mikrowellenofen	<i>BOSCH, Stuttgart, Deutschland</i>
Thermocycler Uno-Thermoblock	<i>Biometra, Göttingen, Deutschland</i>
UV-Transilluminator	<i>LK Bromma, Stockholm, Schweden</i>
Spectrophotometer GeneQuant pro	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, England</i>
Wasserbad	<i>Julabo, Seelbach, Deutschland</i>
Brutschranke "Forma Series II 3110 Water Jacketed CO2 Incubator"	<i>Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland</i>

Tab. 2-1 Geräte

Substanz	Bezugsquelle
Ethanol absolut	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Isopropylalkohol (2-Propanol)	<i>Merck, Darmstadt, Deutschland</i>
Proteinase K	<i>Qiagen, Düsseldorf, Deutschland</i>
QIAamp DNA Blood Mini Kit	<i>Qiagen, Düsseldorf, Deutschland</i>
Primer (Name und Sequenz)	<i>TIB-MOLBIOL, Berlin, Deutschland</i>
NOD2-675 5	
5'-TGGGGCCTGCTGGCTGAGTG-3'	
NOD2-675 3	
5'-GTGCAGCTGGCGGGATGGAG-3'	
NOD2Ex8-5	
5'-TCTGGCTGGGACTGCAGAGG-3'	
NOD2Ex8-3	
5'-CCCCTCGTCACCCACTCTGTCGC-3'	
NOD2Mwo5	
5'-GGCTAACTCCTGCAGTCTCTTAACTGG-3'	
NOD2Mwo3	
5'-ACTTCCAGGATGGTGTCATTCCGCTCAAGG-3'	
Deoxynukleotid-Mix (dNTP, je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	<i>Sigma, Steinheim, Deutschland</i>
HotStarTaq DNA-Polymerase	<i>Qiagen, Düsseldorf, Deutschland</i>
100bp DNA Molekulargrößenstandard	<i>Cambrex Corporation, East Rutherford, USA</i>

Tab. 2-2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme <i>Msp I</i> <i>BstU I</i> <i>Mwo I</i>	<i>New England BioLabs, Ipswich, USA</i>
Agarose, Typ I-A	<i>Sigma, Steinheim, Deutschland</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma, Steinheim, Deutschland</i>
Ac-muramyl-Ala-D-Glu-NH ₂ (MDP)	<i>Bachem Bubendorf, Schweiz</i>
Cyclohexamid	<i>Sigma, Steinheim, Deutschland</i>
Aqua dest	<i>Braun, Melsungen, Deutschland</i>
autologes humanes Serum	<i>Sigma, Steinheim, Deutschland</i>
BSA (Albumin, bovine Fraktion V solution 30%)	<i>Sigma, Steinheim, Deutschland</i>
EDTA Triplex III	<i>MERCK, Darmstadt, Deutschland</i>
Erythrozytenlysepuffer	<i>Apotheke LMU-Klinikum Innenstadt, München, Deutschland</i>
FCS (fetales Kälberserum)	<i>ATCC, Manassas, USA</i>
Ficoll Paque Plus	<i>Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, England</i>
PBS Puffer	<i>Apotheke Klinikum Innenstadt, München, Deutschland</i>
Penicillin 10000 U/ml	<i>Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien</i>
Streptomycin 10000 µg/ml	<i>Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien</i>
Paraformaldehyd (PFA)	<i>MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn, Deutschland</i>
Trypan-Blau Lösung 0,4%	<i>SIGMA, Steinheim, Deutschland</i>
β-Mercaptoethanol	<i>SIGMA, Steinheim, Deutschland</i>
DNase	<i>Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland</i>
Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i>	<i>SIGMA, Steinheim, Deutschland</i>
Hyaluronidase	<i>SIGMA, Steinheim, Deutschland</i>
Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS)	<i>PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland</i>
Annexin V-FITC	<i>CALTAG Laboratories, Burlingame, USA</i>
anti-human CD45-APC	<i>CALTAG Laboratories, Burlingame, USA</i>

Tab. 2-2 Chemikalien und Reagenzien

2.1 Labormaterial und Geräte

Substanz	Bezugsquelle
anti-human CD3-APC	CALTAG Laboratories, Burlington, USA
anti-human CD14-APC	CALTAG Laboratories, Burlington, USA
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Auburn, USA
APC-mouse-IgG ₁	CALTAG Laboratories, Burlington, USA

Tab. 2-2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lyse-Puffer	155 mM NH ₄ Cl 400 mM NaCl 10 mM EDTA
Kernlysepuffer	10 mM Tris/HCL pH 8 400 mM NaCl 10 mM EDTA
gesättigte Natriumchloridlösung	5 M NaCl
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung	20%
TE-Puffer	10 mM Tris/HCL pH 8 1 mM EDTA
Aqua ad injectabilia	Braun
NE-Buffer 2 (10x)	500 mM NaCl 100 mM Tris-HCl 100mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol
NE-Buffer Mwo I (10x)	1500 mM NaCl 500 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiotreitol
10 x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8

Tab. 2-3 Puffer und Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
DNA-Auftragspuffer	10 mM Tris/HCL pH 8 2 mM EDTA 20% Ficoll 400 0,25% Orange G
FACS Puffer	PBS 5% FCS
Binding Buffer	140 mM NaCl 2.5 mM CaCl ₂ 10 mM HEPES/NaOH pH 7.4 0,02% Natrium Azid

Tab. 2-3 Puffer und Lösungen

Artikel	Bezugsquelle
Polaroidfilm Typ 667	<i>Polaroid, Concord, USA</i>
Sarstedt Monovette Lithium Heparin 10ml	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
Sarstedt Monovette EDTA 10ml	<i>Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</i>
MACS Separation Columns LS	<i>Miltenyi Biotec, Auburn, USA</i>
MACS Pre-separation Filters	<i>Miltenyi Biotec, Auburn, USA</i>
Leucosep tubes	<i>Greiner, Frickenhausen, Deutschland</i>
Pipettenspitzen	<i>Eppendorf, Hamburg, Deutschland</i>
48-well-Platten	<i>Greiner, Frickenhausen, Deutschland</i>
24-well-Ultra-Low-Attachment-Platten	<i>Corning Incorporated, Acton, USA</i>

Tab. 2-4 Verbrauchsmaterial

2.2 Probenmaterial

Nach schriftlicher Einverständniserklärung wurde von freiwilligen gesunden Spendern oder Morbus Crohn-Patienten Vollblut aus peripheren Venen in vorgefertigte Röhrchen mit Heparinsalz als Antikoagulanzen entnommen. Diese Blutentnahmen fanden entweder im Rahmen von Kontrolluntersuchungen oder nach telefonischer Einbestellung zum einen in der gastroenterologischen Ambulanz der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt München zum anderen, insbesondere bei der Kontrollgruppe, durch Mitarbeiter im Labor statt. Die Blutproben wurden bei Raumtemperatur (RT) gelagert und spätestens nach 4 Stunden weiterverarbeitet.

2.2.1 Probandenbeschreibung

Alle untersuchten Probanden nahmen freiwillig an der Studie teil und wurden hinsichtlich der Zielsetzung der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde von der Ethikkommission der LMU bewilligt (Projekt-nummer: 081/05).

Gesunde Studenten und Klinikpersonal des Klinikums München standen als **Kontrollkollektiv** freiwillige Kontrollen zur Verfügung.

Das Patientenkollektiv wurde aus dem Patientengut des Klinikums der Universität München ausgewählt. Als Voraussetzung zur Aufnahme in die Studie wurde eine anhand klinischer, endoskopischer, radiologischer und histologischer Kriterien gesicherte Diagnose eines Morbus Crohn festgelegt. Keine der Patienten befand sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einem akuten Schub und keine der Patienten hatte in den 6 Monaten zuvor eine Therapie mit Anti-TNF- α -Antikörpern erhalten. Alle Studienpatienten waren europäischer Herkunft. **Patientenkollektiv**

2.2.2 Isolation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs)

Um mononukleäre Zellen, dazu zählen Monozyten und Lymphozyten, zu isolieren, wurde heparinisiertes Vollblut 1:2 mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) verdünnt. 20 ml Ficoll wurde mit 15-30 ml verdünntem Blut in Leucosep-Röhrchen überschichtet und 35 Minuten bei 4°C und 400 g zentrifugiert. Der Rotor wurde am Ende der Zentrifugation nicht abgebremst, um den Dichtegradienten nicht zu vermischen. Die mononuk-

leären Zellen flotieren in der Plasma-Ficoll-Interphase des Gradienten als weißliche Schicht und wurden qualitativ abgenommen. Diese Zellpopulation stellt die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) dar.

2.2.3 Isolation von Monozyten und Lymphozyten

Zur weiteren Isolation von Monozyten oder Lymphozyten aus den PBMCs wurden die Zellen anschließend zweimal mit PBS und einmal mit PBS + 0,5% BSA und 2 mM EDTA gewaschen und nach jedem Waschschrift 10 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Anschließend wurden 7 ml MACS-Puffer (PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA + 1% humanes Serum) zu dem Zellpellet gegeben, 10 µl Zellsuspension entnommen und auf einem Hämozytometer 1:2 mit Trypan-Blau verdünnt zur Ermittlung der Zellzahl und der Zellvitalität aufgetragen. Die restliche Zellsuspension wurde bei 300 g 10 Minuten abzentrifugiert.

Die weiteren Schritte wurden mit Zellisolations-Kits der Firma Miltenyi Biotec Inc nach deren Angaben durchgeführt:

Prinzip der MACS-Isolation

Die sogenannte MACS-Isolationstechnik der Firma Miltenyi Biotec basiert auf ein System, in welchem magnetisch markierte Antikörper an spezifische Zielzellen binden und dann nach Anlegen eines magnetischen Feldes dazu führen, dass diese Zellen von nicht markierten Zellen getrennt werden. Hierbei kann man eine negative wie auch positive Selektion anwenden. In der negativen Selektion werden alle Zellen, welche nicht weiter benötigt werden mit magnetischen Antikörpern markiert, die Zielzellen werden nicht markiert und wandern somit unbeeinträchtigt durch das magnetische Feld und werden in einer Elution aufgefangen. Bei der positiven Selektion werden nur die Zielzellen markiert und in dem magnetischen Feld zurückgehalten.

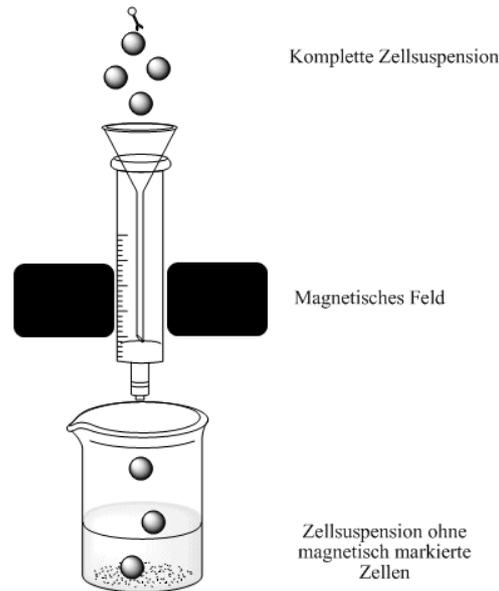


Abbildung 2-1: Prinzip der MACS-Separation. Magnetisch markierte Zellen werden in einer magnetischen Säule zurückgehalten, unmarkierte Zellen werden aufgefangen.

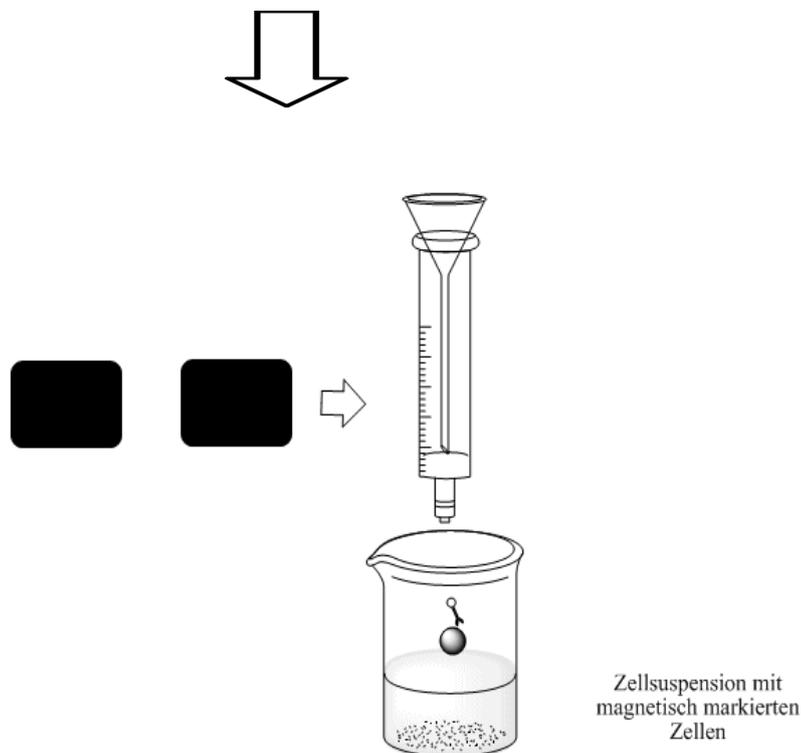


Abbildung 2-2: In einem zweiten Schritt wird die magnetische Säule entfernt und die markierten Zellen in einem separaten Gefäß aufgefangen.

Für die weitere Isolation von Monozyten mit dem "Monocyte Isolation Kit II" (Miltenyi Biotec Inc) wurden 30 µl des MACS-Puffers, 10 µl des FcR *Blocking Reagents* und 10 µl des *Biotin Antibody Cocktails* (CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, und CD235a (Glycophorin A) MicroBeads) pro 10^7 Zellen hinzugefügt, gemischt und 10 Minuten bei 4-8°C inkubiert. Anschließend wurden 30 µl des MACS-Puffers und 20 µl der *Anti-Biotin MicroBeads* hinzugefügt, gemischt und 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert.

Isolation von Monozyten (negative Selektion)

Isolation von Lymphozyten (negative Selektion)

Für die weitere Isolation von Lymphozyten mit den *CD14 MicroBeads* (Miltenyi Biotec Inc) wurden 80 µl MACS-Puffer und 20 µl *CD14 MicroBeads* pro 10^7 Zellen hinzugefügt, gemischt und 15 Minuten bei 4-8°C inkubiert.

Weitere Schritte zur Isolation von Monozyten und Lymphozyten

Nach der letzten Inkubation wurden die Zellen mit 1 -2 ml MACS-Puffer gewaschen, bei 300 g abzentrifugiert und anschließend in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf die vom Magneten umgebenen und zuvor mit MACS-Puffer equilibrierten MACS-Separationssäulen gegeben. Die Säulen wurden dreimal mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und die durchfließenden Zellen aufgefangen. Die zurückbleibenden Zellen wurden nach Entfernung des Magneten ebenfalls mit dem MACS-Puffer eluiert und für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

2.2.4 Isolation der mononukleären Zellen aus der Lamina propria (LPMC)

Für die Isolation von mononukleären Zellen aus der Lamina propria (LPMCs) wurden während Kontrollendoskopien von nicht an einer CED erkrankten Patienten nach Aufklärung und Einverständnis Biopsien zur Weiterverarbeitung entnommen. Bei der verwendeten Methode handelt es sich um eine enzymatische Lösung des Gewebeverbandes.

Pro Patient wurden ca. 6 Biopsien entnommen und in RPMI-Medium, welches mit 10% FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde, aufgenommen. Die Biopsien wurden zweimal in PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und danach für 30 Minuten bei 37°C mit 175 U/min in PBS mit 5% FCS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT und 1% Penicillin/Streptomycin geschüttelt. Anschließend wurden die Biopsien zweimal in PBS gewaschen und dann in 1 ml Verdauungsmedium (DNAse 0,1 mg/ml, Collagenase V 1mg/ml, Hyaluronidase 0,1mg/ml, in Hank's balanced salt solution mit Calcium, ohne Phenolrot) gegeben. Ein weiteres Mal wurden die Biopsien bei 37°C und 175 U/min 30 Minuten lang geschüttelt und anschließend nach Zugabe von 4 ml RPMI-Medium 5 Minuten bei 4°C und 2400 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet ein weiteres Mal mit 5 ml RPMI-Medium gewaschen. Danach wurde die Zellsuspension in 5 ml RPMI-Medium durch ein Zellsieb gegeben und ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypan-Blau zum Ausschluss toter Zellen gefärbt und gezählt. Die restliche Zellsuspension wurde bei 400 g und 4°C abzentrifugiert und der Zellzahl angepasst in frischem Medium resuspendiert.

2.3 Stimulation der Zellpopulationen

2.3.1 Stimulation für die Zytokinanalyse

Für die Untersuchung der Zytokinausschüttung von Monozyten nach Stimulation mit MDP wurde folgender Versuchsansatz angewendet:

Nach Isolation der Monozyten wurden die Zellen in RPMI-Medium (+2mM L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% humanes Serum) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml überführt und je 200 μ l von dieser Zellsuspension in 24er-well Platten über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium entfernt und durch neues Medium mit oder ohne Stimulus ersetzt. Für jeden Patienten bzw. jede gesunde Kontrolle war der Versuchsaufbau wie folgt:

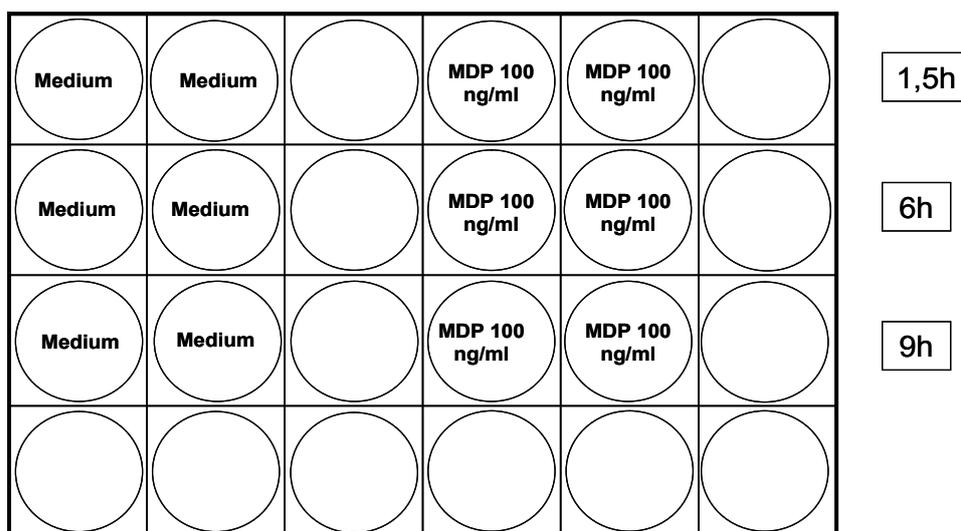


Abbildung 2-3: Stimulationen für Zytokinuntersuchungen

Nach Inkubation über 1,5, 6 oder 9 Stunden wurde das Medium abpipettiert und für weitere Konzentrationsbestimmungen von Zytokinen bei -80°C aufbewahrt. Für die mRNA Bestimmungen wurden die verbliebenen Zellen in β -Mercaptoethanol aufgenommen und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2 Stimulation für die Apoptoseanalyse

PBMCs, Lymphozyten und Monozyten wurden in einer Konzentration von $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI-Medium (10mM HEPES + 2mM Glutamin + 100 U/ml Pen/Strep + 10% humanes Serum) überführt. Um die Adhärenz von Monozyten zu verhindern, wurde jeweils 500 μ l der Zellsuspension von PBMCs und Monozyten in 24er-well

PBMCs, Lymphozyten und Monozyten

Ultra-Low-Attachment-Platten überführt. Zum Vergleich wurden Monozyten auch in 24er-well Standardplatten kultiviert, um einen möglichen Effekt der Adhärenz bzw. der Adhärenzunterdrückung zu untersuchen. Zur Stimulation wurden folgende Konzentrationen und Stimulantien verwendet:

Medium alleine
MG132 (3 μ M)
MDP (verschiedene Konzentrationen)
MDP + MG132 (3 μ M)
Cyclohexamid 100 μ g/ml

Tab. 2-5 *Stimulationen für Apoptoseuntersuchungen*

Nach verschiedenen Inkubationszeitpunkten (3h, 8h, 24h und 48h) wurden die Zellen für die Apoptoseanalyse entnommen und weiterverarbeitet.

2.4 Zytokinmessung mittels ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration der zu untersuchenden Zytokine wurden fertige ELISA-Kits unterschiedlicher Firmen verwendet (s. Tabelle 2-5). Die Konzentrationen des jeweiligen Zytokins wurden in den zuvor gewonnenen Zellüberständen gemessen. Die Durchführung wurde nach Herstellerangaben praktiziert. Die Absorptionsmessung der entwickelten ELISAs erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben bei den angegebenen Wellenlänge am Thermo Varioskan.

ELISA	Bezugsquelle
TNF- α ELISA	<i>BioSource Europe, Verviers, Belgien</i>
IL-10 ELISA	<i>BioSource Europe, Verviers, Belgien</i>
IL-1 β ELISA	<i>BD Bioscience, San Diego, USA</i>
IL-12p40 ELISA	<i>BD Bioscience, San Diego, USA</i>

Tab. 2-6 *Verwendete ELISA-Kits*

2.5 Nachweis apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung

In der frühen Phase der Apoptose erfolgt eine Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der Innen- zur Außenseite der Zellmembran. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phospha-

2.5 Nachweis apoptotischer Zellen mittels Annexin V-Färbung

tidylserin (Vermees et al., 1995) und kann daher als Nachweismolekül für die Exposition von PS auf der Plasmamembranaußenseite apoptotischer Zellen dienen. In der späten Phase der Apoptose kommt es zum Verlust der Membranintegrität sterbender Zellen, wodurch PS auch auf der Membraninnenseite für Annexin V zugänglich wird. Um die späte Phase von der frühen Phase der Apoptose zu unterscheiden, wird Propidiumiodid (PI) verwendet, welches durch Verlust der Membranintegrität nekrotischer oder spät-apoptotischer Zellen intrazellulär gelangt. In der späten Phase der Apoptose können PI und Annexin V gleichzeitig in die Zellen eindringen, wobei PI mit der genomischen DNA interkaliert und Annexin V an das PS der Zellinnenmembran bindet.

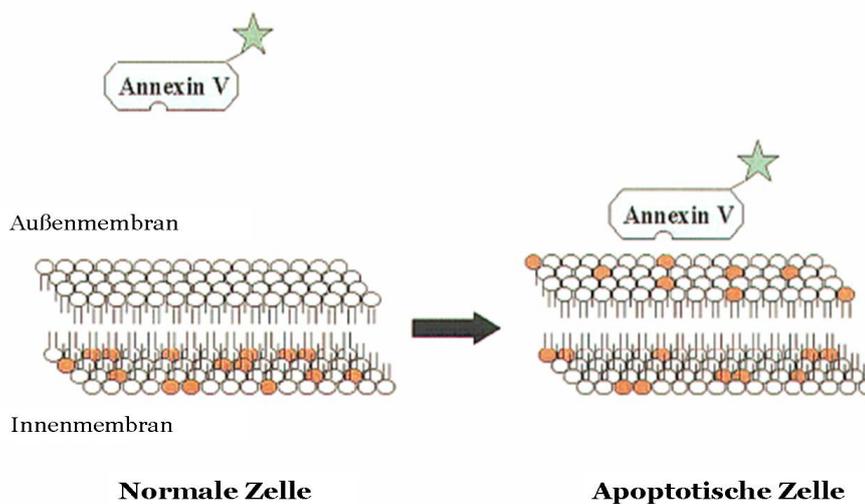


Abbildung 2-4: Darstellung der PS-Asymmetrie (rote Kugeln) und ihr Verlust durch Apoptose. In Anwesenheit von Calcium kann ein Fluoreszenz-markiertes Annexin V-Molekül an nach außen gekehrtes PS binden (modifiziert nach van England 1997).

Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen entnommen, bei 300 g abzentrifugiert und der Überstand für eventuelle Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Monozyten, welche in Standardplatten kultiviert worden sind, wurden durch Trypsinierung von den Platten abgelöst. Anschließend wurden die Zellen mit unterschiedlichen Oberflächen-Antikörpern (s. Tabelle) in 100 µl FACS Puffer 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml *Binding Buffer* gewaschen und mit Annexin V-FITC, welches 1:40 mit Binding Buffer verdünnt worden war, 10 min bei RT im Dunklen inkubiert. Als letzter Schritt wurden die Zellen mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 1:100 mit *Binding Buffer* verdünntem PI aufgenommen und spätestens 15 Minuten später im Durchflusszyto-

Färbeprotokoll

meter gemessen.

Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-human CD3- APC	1:20	CALTAG Laboratories, Burlingame, USA
anti-human CD14-APC	1:50	CALTAG Laboratories, Burlingame, USA
anti-human CD45-APC	1:50	CALTAG Laboratories, Burlingame, USA

Tab. 2-7 Verwendete Antikörper zur Zellcharakterisierung

Zellen, welche ein stark Annexin V-positives Signal aufwiesen, wurden als apoptotisch gewertet. Abhängig von dem PI-Signal konnte dann zwischen früh- und spät-apoptotischen Zellen unterschieden werden. Oberflächenmarker wurden zur Identifikation der untersuchten Zellen verwendet. Eine Kombination mit morphologisch zu bestimmenden Parametern führte hierbei zu einer größeren Genauigkeit in der Bestimmung der Zellidentität.

2.6 Durchflusszytometrie

Für alle Messungen wurde ein FACS Calibur der Firma BD Bioscience verwendet, das mit zwei Lasern zur Anregung der Fluoreszenz ausgestattet ist.

Verwendete Mess- und Auswertesoftware

Die durchflusszytometrischen Messungen und die Analyse der gemessenen Daten wurden mit folgenden Programmen durchgeführt:

- **WinMDI 2.5** Shareware frei erhältlich unter der Internetadresse <http://facs.scripps.edu>
- **CellQuest** Version (BD)
- **Excel 2003**
- **BD FACSDiva** Software
- **SPSS** Version 14.0 (SPSS, Chicago, IL, USA)

2.6.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer analysiert fokussierte Partikel hinsichtlich ihrer Streuung von Lichtsignalen und ihrer Fluoreszenz mittels optischer Messungen. Dadurch ist es möglich, eine multiparametrische Analyse mehrerer physikalischer und biochemischer Eigenschaften einzelner Zellen durchzuführen. Zur durchflusszytometrischen

Messung sind Zellen jeglicher Herkunft geeignet, wenn diese als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Adhärenz wachsende Zellen oder Gewebeverbände müssen vor der Analyse mechanisch oder enzymatisch vereinzelt werden.

Hüllstromflüssigkeit (oder Mantelstromflüssigkeit) wird aus dem Vorratsbehälter kontinuierlich durch die Messkammer in den Abfallbehälter gepumpt. Die Zellen vom Probenröhrchen werden über ein zweites Leitungssystem in die Messkammer geleitet. Die Hüllflüssigkeit strömt laminar durch die Küvette, erfasst die Probensuspension und vereinigt damit die beiden Flüssigkeitsströme in der Messkammer. Durch eine Verengung des Flüssigkeitsstromes auf das Zentrum der Messküvette erfährt der Flüssigkeitsstrom eine Beschleunigung von wenigen Zentimetern in der Sekunde auf etwa sieben Meter pro Sekunde. Dieser Vorgang wird auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet und gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen nacheinander aufgereiht die beiden räumlich getrennten Messpunkte der beiden Laserstrahlen passieren. Argon- und Diodenlaser werden an räumlich getrennten Stellen entlang des Probenstrahls fokussiert. Die fluoreszenten Emissionen jedes Lasers werden an räumlich getrennten Positionen abgebildet, wodurch eine Detektion der Fluoreszenzsignale ohne Kontamination durch den anderen Laserstrahl gewährleistet wird. Die Signale eines einzelnen Teilchens zu verschiedenen Zeitpunkten werden durch diese räumliche Trennung generiert. Das Signal des roten Lasers wird elektronisch verzögert, so dass das Signal die Analyse-Elektronik zur selben Zeit erreicht wie das Signal vom blauen Laser.

Flüssigkeits-system

Das optische System lässt sich in einen Anregungsteil und einen Detektionsteil unterteilen. Als Durchflusszytometer wurde ein Zwei-Laser-Gerät FACSCalibur mit einem Argonionenlaser mit einer Leistung von 15 mW bei 488 nm Anregungslinie und einem Diodenlaser mit 635 nm Anregungswellenlänge verwendet. Streulichtsignale und Fluoreszenzsignale werden im Detektionsteil gemessen. Zelluläre Eigenschaften wie Querschnittsfläche, Membranstruktur sowie Menge und Beschaffenheit intrazellulärer Granula und Vakuolen bestimmen die Streuung des Laserlichts.

Optisches System

Am größten ist die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich von 0 - 10° des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter [FSC]). Ein indirektes Maß für die Querschnittsfläche des Messobjektes ist die Intensität des Vorwärtsstreulichts und gibt somit Aufschluss über die Zellgröße. Ein geringerer Teil des Laserlichtes wird im 90° Winkel gestreut. Dieses Seitwärtsstreulicht (Side Scatter [SSC]) ist proportional zum Brechungsindex des Messobjektes und kann daher die Granularität der Zellen bestimmen. Neben Streulichtsignalen wurden zusätzlich drei

bzw. vier Fluoreszenzsignale durchflusszytometrisch analysiert.

Signalverarbeitung Photodetektoren im Durchflusszytometer wandeln optische Signale in elektrische Pulse, deren Höhe mit der Intensität des Lichtsignals korrelieren, um. Photodioden werden für die Signale des FSC eingesetzt, Photoröhren (photomultiplier tube, PMT) für die schwächeren Signale des SSC und der Fluoreszenzen. Zusätzlich werden die elektrischen Signale des Streulichtes linear und die Fluoreszenzsignale logarithmisch verstärkt. Eine elektronische Schwelle (threshold) kann zur Unterdrückung von Rausch und Störsignalen auf einen beliebigen Parameter (Trigger) gesetzt werden. Mithilfe eines Analog-/Digitalwandlers werden die gemessenen und verstärkten Signalintensitäten der Photodetektoren digitalisiert. Als Listendateien (List-Mode) werden die so erhaltenen Rohdaten gespeichert. Für jede gemessene Zelle werden dabei die Streu- und Fluoreszenzsignale in der gleichen Reihenfolge, in der die Zellen die Messküvette passierten, aufgezeichnet. Dadurch wird der Ablauf des gesamten Messvorganges dokumentiert und erlaubt auch nach längerer Zeit eine Datenauswertung nach unterschiedlichsten Kriterien.

**Fluoreszenzkom-
pensation** Bei der Mehrfarbenanalyse überlappen die eingesetzten Fluorochrome so stark, dass sie durch die optischen Filter des Durchflusszytometers nicht vollständig voneinander abgetrennt werden können. Deshalb muss für die quantitative Analyse von Oberflächenmolekülen die spektrale Überlappung zusätzlich durch elektronische Kompensation korrigiert werden. Von jedem Signalpuls wird dazu der durch die Überlappung verursachte Fluoreszenzanteil subtrahiert.

**Geräteein-
stellungen** Die Einstellung der Messparameter, wie Verstärkung der PMT, Kompensation und Schwellenwerte sowie deren Stabilität wurde mit einfach gefärbten und ungefärbten Zellen vorgenommen. Die Streulichtsignale wurden für alle Messungen linear und die Fluoreszenzsignale logarithmisch aufgenommen. Über den Parameter des Vorwärtsstreulichtes wurde der Schwellenwert zur Ausgrenzung von Debris (Zellschrott) definiert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Isolation genomischer DNA

Ausgangsmaterial für die Isolierung der genomischen DNA waren von Monozyten gereinigte Lymphozytenpopulationen einerseits und Vollblutproben der Patienten und Kontrollen andererseits.

Für die gereinigten Lymphozyten wurde zur Isolation von genomischer DNA ein kommerziell erhältlicher Kit (QIAamp DNA Blood Mini Kits, Qiagen) verwendet, für die Isolation aus Blutproben die Aussalzmethode nach Miller (Miller 1988).

Nach Isolation wurden die Lymphozyten bei -20°C eingefroren und gelagert. Nach Auftauen wurde 20 μl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) und 200 μl von dem im Kit enthaltenen Lysepuffer AL hinzugegeben und sorgfältig auf dem Vortex-Schüttler gemischt. Danach wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße 10 Minuten im Wasserbad bei 56°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 μl 100%igem Ethanol und erneutem Mischen wurde das Lysat auf die dafür vorgesehene Säule übertragen und für eine Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die sich in der Lösung befindende DNA bindet hierbei an die Silica-Gel-Matrix der Säule. Im weiteren Verlauf erfolgten zwei Waschschriffe. Im ersten Waschschriffe wurden 500 μl Puffer AW1 auf die Säule geladen, für 1 Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im zweiten Waschschriffe wurden 500 μl Puffer AW2 auf die Säule geladen, für 3 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um möglichst alle Reste des ethanolhaltigen Puffers AW2 zu beseitigen, wurde ein zusätzlicher Zentrifugationsschriffe für 1 Minute bei 13.000 Upm durchgeführt. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein sauberes 1,5 ml-Gefäß platziert und 200 μl Elutionspuffer AE direkt auf die Membran der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 13.000 Upm. Um die Ausbeute bei möglichst hoher Konzentration weiter zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Säule aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt. Die so gewonnene DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

Isolierung der DNA aus Lymphozyten mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits

Die Blutproben wurden in 10 ml EDTA-Röhrchen (S-Monovette® 10 ml EDTA, Sarstedt) abgenommen. Die Röhrchen wurden am selben Tag bei 2.000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert und das überstehende Plasma abpipettiert. Das Sediment wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) überführt und zur Eliminierung der Erythrozyten, welche keine DNA enthalten, wurde ein hypotonischer Erythrozytenlysepuffer bis zu einem Gesamtvolumen von 12 ml zugegeben.

Isolierung der DNA nach der Aussalzmethode (Miller 1988)

Die Röhren wurden anschließend bei Raumtemperatur auf einem Rotator (Bachofer) einige Minuten inkubiert, bis die Lösung - aufgrund einer vollständigen Lyse der im Vergleich zu den kernhaltigen Leukozyten deutlich weniger osmotisch resistenten Erythrozyten - klar geworden ist. Danach erfolgte die Sedimentation der Leukozyten durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2.000 Upm. Der Überstand wurde verworfen, das Leukozytensediment in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Gefäß überführt. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 5.000 Upm wurde der Überstand erneut verworfen und das Leukozytensediment entweder sofort zur DNA-Isolierung verwendet oder bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in 6 ml Kernlysepuffer durch Auf- und Abpipettieren sowie durch Mixen auf dem Vortex-Schüttler resuspendiert. Zur Degradation von Membran- und Proteinanteilen wurden SDS (Endkonzentration 1%) und Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für mindestens drei Stunden, meist aber über Nacht. Während dieser Inkubationszeit wurde wiederholt kräftig auf dem Vortex-Schüttler gemixt, um die DNA zu scheren und besser in Lösung zu bringen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die DNA vollständig löst und nicht mehr als geleeartiges Aggregat vorliegt, da sie sonst bei den weiteren Schritten verloren geht. Um sie vollständig in Lösung zu bringen, wurde das Volumen an Kernlysepuffer gegebenenfalls erhöht und die Inkubation bei 37°C verlängert. Zur Fällung der Protein- und Membranfragmente wurde 1/3 Volumen 5 M NaCl-Lösung zugegeben, kräftig gemixt und für mindestens 30 Minuten oder über Nacht bei 4°C oder auf Eis inkubiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3.600 Upm wurde der Überstand abpipettiert und nochmals 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde in ein neues Röhren überführt, mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt und langsam gemischt. Die fadenförmig ausgefallene DNA wurde mit einer automatischen 200 µl Pipette aufgenommen und zweimal in 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde zur Trocknung von der Spitze in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß an dessen Wand im unteren Abschnitt überführt. Dadurch wird ein Verlust der getrockneten DNA (vor allem bei geringer Ausbeute) durch Abfallen von der Spitze vermieden. Die getrocknete DNA wurde je nach Menge in 100-500 µl TE-Puffer gelöst. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C.

2.7.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung für die drei Hauptmutationen von NOD2, welche mit Morbus Crohn assoziiert sind, wurde wie schon zuvor beschrieben durchgeführt (Torok, 2005b).

2.7 Molekularbiologische Methoden

Zunächst wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, gefolgt von einem Restriktionsverdau und anschließender Gelelektrophorese.

Folgende Primer wurden verwendet:

Polymorphismus	5'-Primer-sequenz	3'-Primer-sequenz	Produktlänge (bp)	Primer-Annealing T°C	MgCl ₂
NOD2 c.C2104C>T p.R702W	5'TGGGGC CTGCT- GGCT- GAGTG-3'	5'GTGCAG CTGGCGG GATGGAG- 3'	121 bp	65°C	1,5 mM
NOD2 c.G2722G>C p.G908R	5'TCTGGC TGGGACT- GCAGAGG- 3'	5'-CCCCT- CGTCACC CACTCT- GTCGC-3'	131 bp	65°C	3 mM
NOD2 c.3019_3020insC p.Leu1007fsX1008	5'GGCTAA CTCCT- GCAGTCT- CTTAACT GG-3'	5'ACTTCCA GGATGGT- GTCATTCC GCTCAAG G-3'	169 bp	55°C	3 mM

Tab. 2-8 Verwendete Primer zur NOD2-Typisierung

Für den Restriktionsverdau wurden folgende Restriktionsenzyme verwendet unter spezifischen Bedingungen:

Polymorphismus	Enzym	Endkonzentration des Enzyms	Restriktionspuffer	Restriktionstemperatur
NOD2 c.C2104C > T p.R702W	<i>Msp I</i>	1,6 U/µl	NEBuffer 2	37°C
NOD2 c.G2722G > C p.G908R	<i>BstU I</i>	0,8 U/µl	NEBuffer 2	60°C
NOD2 c.3019_3020insC p.Leu1007fsX1008	<i>Mwo I</i>	0,5 U/µl	NEBuffer Mwo I	60°C

Tab. 2-9 Verwendete Restriktionsenzyme

Nach Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese wurde das Gel auf dem UV-Transilluminator betrachtet, fotografiert und hinsichtlich des Genotyps ausgewertet.

2.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS 14.0. Gepaarte Stichproben wurden mithilfe des Wilcoxon-Tests verglichen, ungepaarte Stichproben mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der genetischen Analyse

3.1.1 Untersuchungskollektiv

Für alle Untersuchungen wurden Morbus Crohn-Patienten und gesunde Kontrollen verwendet. Unter den gesunden Kontrollen befanden sich nach Genanalyse *NOD2*-Wildtyp-Individuen und auch Mutationsträger (s. *Tab. 3-1*). Morbus Crohn-Patienten wurden anhand von vorhandenen Gendatenbanken ausgewählt.

Die Auswahl der Probanden fand für die Zytokinanalyse und für die Apoptoseuntersuchungen auf die gleiche Weise statt. Patienten wurden aus vorhandenen Gendatenbanken ausgewählt und außerdem hinsichtlich ihrer momentanen klinischen Symptomatik und Therapie ein- bzw. ausgeschlossen. Keine der Patienten befand sich zur Zeit der Blutentnahme in einem akuten Schub und keiner hatte innerhalb der letzten 6 Monate vor Blutentnahme eine Therapie mit Anti-TNF- α -Antikörpern (Infliximab) erhalten.

Die genaue Aufteilung der Genotypen in der Patienten- bzw. Kontrollgruppe wird in dem jeweiligen Unterkapitel Zytokinanalyse bzw. Apoptoseuntersuchung beschrieben, da sich diese aufgrund der unterschiedlichen Fragestellung unterscheiden.

3.2 Zytokinanalyse

3.2.1 Untersuchungskollektiv

Für diese Untersuchung wurden Monozyten von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen unterschiedlichen *NOD2*-Genotyps verwendet. In der Studie wurden Wildtyp-*NOD2*-Individuen (WT), *NOD2*-heterozygote Individuen (HT), *NOD2*-compound-heterozygote Individuen (cHT), also Träger zweier verschiedener Morbus Crohn-assoziierte *NOD2*-Mutationen und *NOD2*-homozygote Individuen (HZ) eingeschlossen.

<i>NOD2</i>-Genotyp Varianten	Kontrollen	Patienten	Gesamt
Wildtyp (WT)	11	16	27
Heterozygot (HT) 1007fs	1	5	6
Heterozygot (HT) R702W	2	3	5
Heterozygot (HT) G908R	0	1	1
compound-Heterozygot (cHT) 1007fs/R702W	1	2	3
compound-Heterozygot (cHT) 1007fs/G908R	0	1	1
compound-Heterozygot (cHT) R702W/G908R	0	3	3
Homozygot (HZ) 1007fs	0	7	7
Homozygot (HZ) R702W	0	1	1
Homozygot (HZ) G908R	0	1	1
Gesamt	15	40	55

Tab. 3-1 Liste der untersuchten Genotypen (WT Wildtyp, HT Heterozygot, cHT compound- Heterozygot, HZ Homozygot)

3.2 Zytokinanalyse

Die demographischen Daten der untersuchten Individuen stellen sich wie folgt dar:

Genotyp <i>NOD2</i>	Kontrollen				Patienten			
	WT	HT	cHT	HZ	WT	HT	cHT	HZ
Altersverteilung (J)	26- 55	26- 33	29	-	26- 70	35- 58	26- 39	19- 76
Altersdurchschnitt (J)	32,5	29	29	-	42,4	41,9	34	39,3
Geschlecht (m/w)	3/8	1/2	1/0	0/0	9/7	2/7	4/2	6/3

Tab. 3-2 Epidemiologische Aufteilung des Untersuchungskollektivs (WT Wildtyp, HT Heterozygot, cHT compound-Heterozygot, HZ Homozygot)

3.2.2 TNF- α -Freisetzung

Die TNF- α -Freisetzung von MDP-stimulierten Monozyten wurde mittels ELISA nach 6h gemessen. Bei der TNF- α -Freisetzung konnten folgende Ergebnisse ermittelt werden:

Nach Stimulation mit MDP konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT-Morbus Crohn-Patienten und WT-Kontrollen sowie zwischen HT-Morbus Crohn-Patienten und HT-Kontrollen festgestellt werden (s. Abbildung 3-1). Deshalb wurde in den folgenden Versuchen dazu übergegangen, die unterschiedlichen *NOD2*-Genotypen unabhängig vom Krankheitsstatus zu untersuchen.

Kein Unterschied in der TNF- α -Freisetzung zwischen Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen

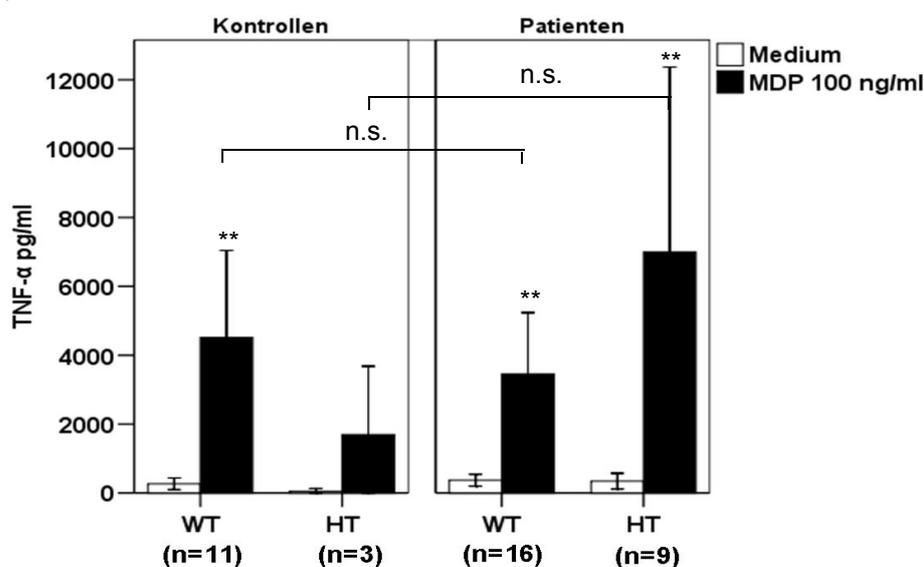
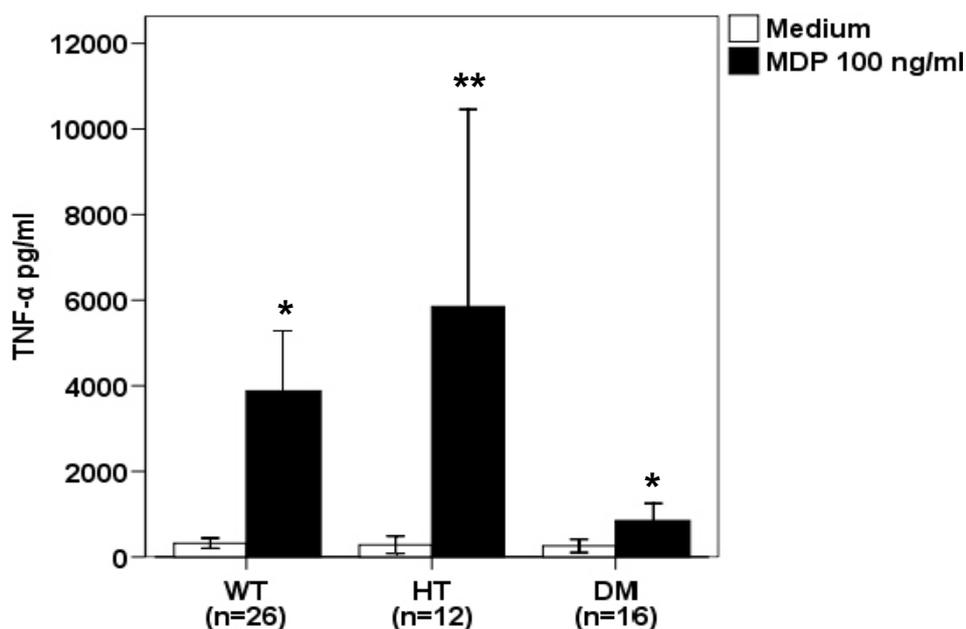


Abbildung 3-1: TNF- α -Spiegel nach MDP-Stimulation von Monozyten von *NOD2*-WT und HT-Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen (** $p < 0,01$ für TNF- α nach Stimulation mit MDP vs Medium allein, n.s. kein signifikanter Unterschied zwischen Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen mit WT- bzw. HT-*NOD2*-Genotyp)

MDP-Stimulation führt zur erhöhten TNF- α -Sekretion bei WT-, HT- und DM-*NOD2*-Trägern

Stimulation mit 100 ng/ml MDP führte bei Monozyten von allen *NOD2*-Genotypträgern zu einer Steigerung der TNF- α -Freisetzung (s. Abb 3-2). Die WT-*NOD2* ($p=0,0064$) wie auch die HT-*NOD2*-Träger ($p=0,0117$) zeigten einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Sekretion. Auch Monozyten von Doppelmutationsträgern (DM) zeigten einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Freisetzung nach Stimulation mit MDP ($p=0,012$). Ein direkter Vergleich der Höhe der TNF- α -Freisetzung nach MDP-Stimulation von DM-*NOD2* mit WT-*NOD2* Trägern zeigte jedoch, dass WT-Monozyten eine signifikant höhere absolute Freisetzung von TNF- α nach Stimulation mit MDP zeigten ($p=0,047$); ein Unterschied, welcher im Vergleich von WT mit HT nicht zu sehen war. Auch der direkte Vergleich des Anstiegs der TNF- α -Sekretion von unstimulierten zu den mit MDP stimulierten Zellen ergibt, dass Monozyten von WT-*NOD2*-Trägern einen signifikant größeren Anstieg als Monozyten von DM-*NOD2*-Trägern zeigen ($p=0,0002$). Zwischen HT-*NOD2*-Trägern und WT-*NOD2*-Trägern ist ein solcher Unterschied nicht zu beobachten.

Abbildung 3-2: TNF- α -Freisetzung nach MDP-Stimulation von Monozyten von *NOD2*-WT, HT und DM unabhängig vom Krankheitsstatus (* $p<0,05$, ** $p<0,01$ für TNF- α nach Stimulation mit MDP vs Medium allein)



Einfluss der 1007fs-*NOD2*-Variante auf die TNF- α -Sekretion bei Doppelmutationsträgern

Die 1007fs-*NOD2*-Variante kodiert für ein trunkiertes Protein mit aufgehobener Rezeptorfunktion, während die anderen beiden Morbus Crohn-assoziierten *NOD2*-Varianten R702W und G908R zu einer Aminosäuresubstitution in oder in der Nähe der LRR-Region mit weniger ausgeprägter Beeinflussung der Proteinfunktion führen. Um zu untersuchen, ob dieses Ausmaß der genetischen Veränderung auch auf funktioneller Ebene reflektiert wird, wurde der spezifische Einfluss der 1007fs-Variante untersucht. Dazu wurde der Einfluss des Vorhandenseins mindestens einer 1007fs-

3.2 Zytokinanalyse

Mutation in Doppelmutationsträgern auf die TNF- α -Sekretion nach Stimulation mit MDP betrachtet. Die Gruppe der Doppelmutationsträger wurde also weiter unterteilt: Doppelmutationsträger ohne eine 1007fs-Variante (DM-1007fs), also G908R- und R702W-homozygote Träger wie auch G908R/R702W-compound-heterozygote Träger, bildeten die eine Gruppe. Komplementär hierzu wurde die Gruppe der Doppelmutationsträger mit mindestens einer 1007fs-NOD2-Variante (DM+1007fs), welche 1007fs-homozygote wie auch 1007fs/G908R- und 1007fs/R702W-compound-heterozygote Träger mit einbezog, gebildet.

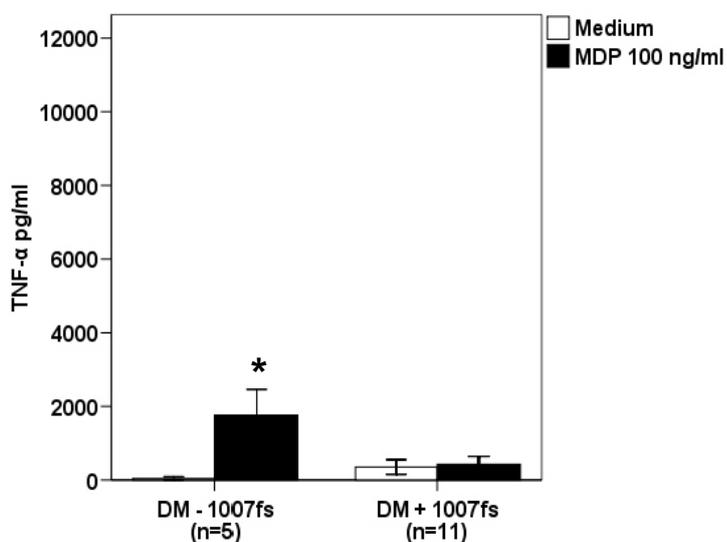


Abbildung 3-3: MDP-induzierte Freisetzung von TNF- α durch Monozyten von Doppelmutationsträgern ohne 1007fs (DM-1007fs) oder mit mindestens einem 1007fs-Allel im NOD2-Gen (DM+1007fs) (* $p < 0,05$ für TNF- α nach Stimulation mit MDP vs Medium allein)

Monozyten von DM-1007fs zeigten nach MDP-Stimulation einen signifikanten Anstieg der TNF- α -Sekretion im Vergleich zu unstimulierten Zellen ($p=0,047$). Im Gegensatz dazu konnte bei Monozyten von DM+1007fs kein Anstieg der TNF- α -Sekretion nach Stimulation mit MDP festgestellt werden. Ein Vergleich dieser beiden Gruppen untereinander zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied in der Höhe der TNF- α -Freisetzung nach Stimulation mit MDP ($p=0,029$).

Diese Beobachtung zeigt, dass das Vorhandensein mindestens einer 1007fs-NOD2-Variante in Doppelmutationsträgern ausreicht, um einen vollständigen Verlust der Rezeptorfunktion zu induzieren.

Mindestens eine 1007fs-NOD2-Variante in Doppelmutationsträgern reicht zur vollständigen Aufhebung der Rezeptorfunktion aus

3.2.3 IL-10-Freisetzung

Die Freisetzung von IL-10 wurde im Gegensatz zu TNF- α erst nach 9h im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen, da vorherige Untersuchungen höhere Werte für

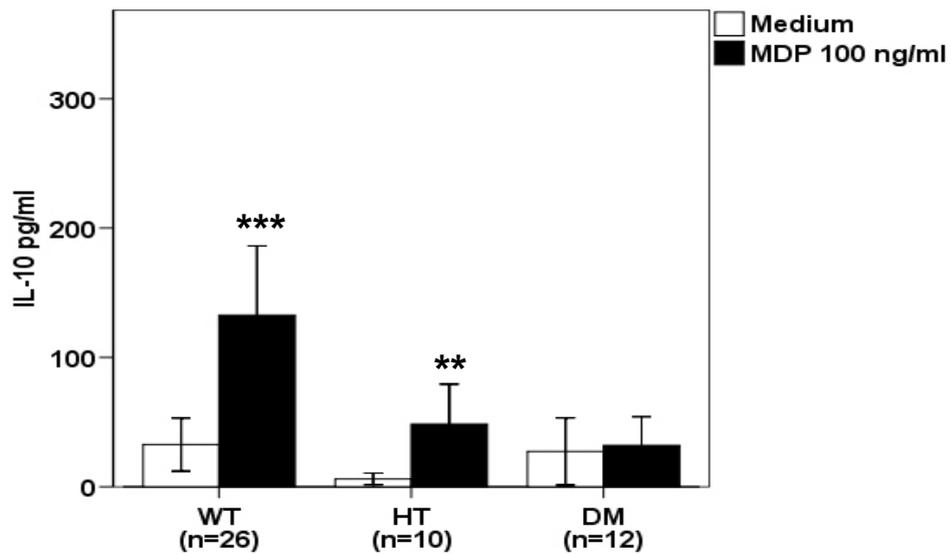
IL-10 zu diesem Zeitpunkt ergeben hatten.

Die Ergebnisse waren vergleichbar zur TNF- α -Untersuchung:

MDP-Stimulation führt zur erhöhten IL-10-Sekretion bei WT- und HT-NOD2-Trägern

Monozyten von WT-Individuen zeigten einen signifikanten Anstieg der IL-10-Freisetzung nach Stimulation mit MDP ($p=0,0018$). Vergleichbar hierzu antworteten Monozyten von HT-Individuen mit einem signifikanten Anstieg der IL-10-Freisetzung nach Stimulation mit MDP ($p=0,0277$). Doppelmutationsträger hingegen zeigten keinen signifikanten Anstieg der IL-10-Freisetzung nach Stimulation mit MDP.

Abbildung 3-4: IL-10-Freisetzung durch Monozyten von WT, HT und DM-NOD2-Trägern nach Stimulation mit MDP (** $p<0,01$, ** $p<0,001$ für IL-10 nach Stimulation mit MDP vs Medium allein)



Einfluss der 1007fs-Variante auf die IL-10-Sekretion bei Doppelmutationsträgern

Auch für die Untersuchung der MDP-induzierten IL-10-Freisetzung wurde die Gruppe der Doppelmutationsträger aufgeteilt in Träger ohne eine 1007fs-NOD2-Variante (DM-1007fs) und in Träger mit mindestens einer 1007fs-NOD2-Variante (DM+1007fs). Die Ergebnisse dieser Aufteilung sind in Abbildung 3-5 zu sehen.

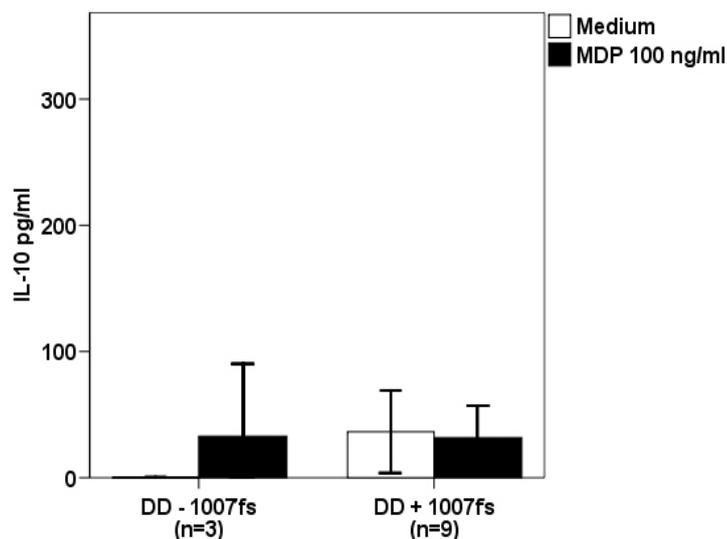


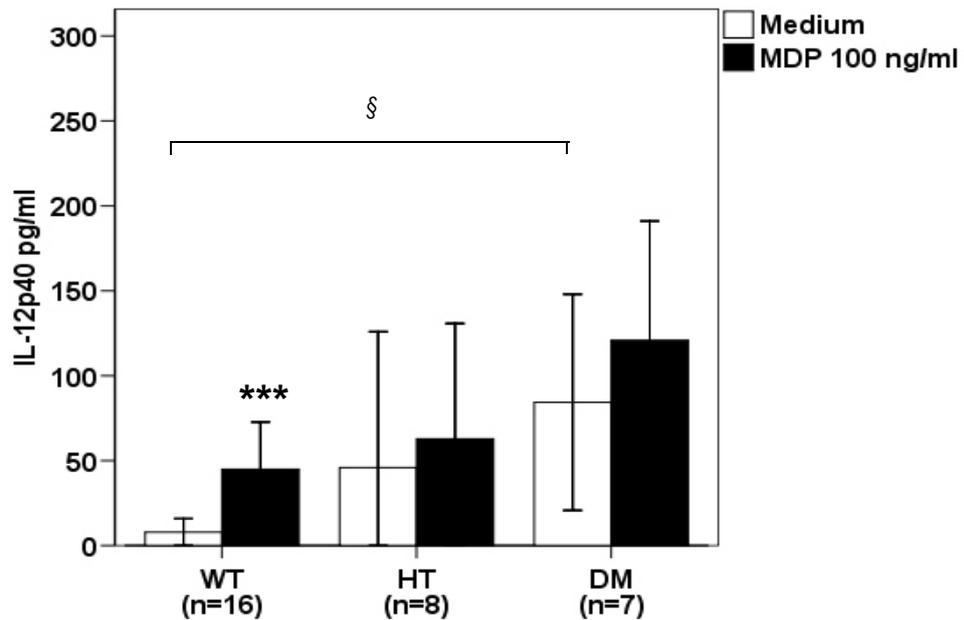
Abbildung 3-5: MDP-induzierte Freisetzung von IL-10 durch Monozyten von Doppelmutationsträgern mit keiner 1007fs (DM-1007fs) oder mindestens einer 1007fs-Variante im NOD2-Gen (DM+1007fs)

Der Anstieg der IL-10-Ausschüttung nach MDP-Stimulation ist bei beiden Gruppen nicht signifikant. Jedoch ist ein stärkerer Anstieg der IL-10-Freisetzung durch Monozyten von DM-1007fs in Vergleich zu DM+1007fs zu sehen (32,7 \pm 28,76 pg/ml vs. 4,6 \pm 4,6 pg/ml; DM-1007fs vs. DM+1007fs). Dieser Unterschied im Anstieg ist jedoch nicht statistisch signifikant. Ein Grund dafür könnte die geringe Anzahl der untersuchten DM-1007fs Gruppe sein.

3.2.4 IL-12p40-Freisetzung

Die IL-12p40-Freisetzung wurde analog zu TNF- α nach 6h im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Ein signifikanter Anstieg nach Stimulation mit MDP wurde bei Monozyten von Wildtyp-Individuen beobachtet ($p=0,006$). Im Gegensatz dazu konnte kein signifikanter Anstieg nach Stimulation mit MDP bei Monozyten von heterozygoten Individuen wie auch von Doppelmutationsträgern festgestellt werden (s.Abbildung 3-6).

Abbildung 3-6: IL-12p40-Level im Zellkulturüberstand von WT-, HT- und DM-NOD2-Monozyten nach Stimulation mit MDP (***) $p < 0,001$ Medium vs MDP Stimulation; § $p = 0,002$ WT Medium alleine vs DM Medium alleine)



Aufgrund der großen Streuung und auch aufgrund von Ergebnissen in der mRNA-Untersuchung (s. Diskussion) ist es zu früh, die Daten insoweit zu interpretieren, dass eine Beeinträchtigung der IL-12p40-Sekretion bei HT-NOD2-Trägern vorliegt.

Erhöhte basale IL-12p40-Level bei Doppelmutations-trägern

Ein interessanter Befund war, dass Monozyten von DM-Trägern einen signifikant erhöhten basalen Level an IL-12p40 im Zellkulturüberstand aufwiesen. Es konnte also ohne vorherige Stimulation mit MDP ein zu WT-Morbus Crohn-Patienten (98,4 \pm 33,8 pg/ml versus 2,7 \pm 1,9 pg/ml; $p = 0,002$) und WT-Kontrollen (15,7 \pm 9,0 pg/ml; $p = 0,008$) erhöhter Level an IL-12p40 gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigte der einzige gesunde DM-Träger in dieser Untersuchung einen sehr niedrigen basalen Level an IL-12p40. Es bestand kein Unterschied zwischen WT- und HT-NOD2-Trägern, sowie zwischen Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen in dem basalen Level der IL-12p40-Freisetzung. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass diese Unterschiede auf den Krankheitsstatus zurückzuführen sind. Auch die Analyse von klinischen Daten der Morbus Crohn-Patienten zeigte keine Korrelation der basalen IL-12p40-Level mit der Krankheitsaktivität oder der aktuellen Medikation.

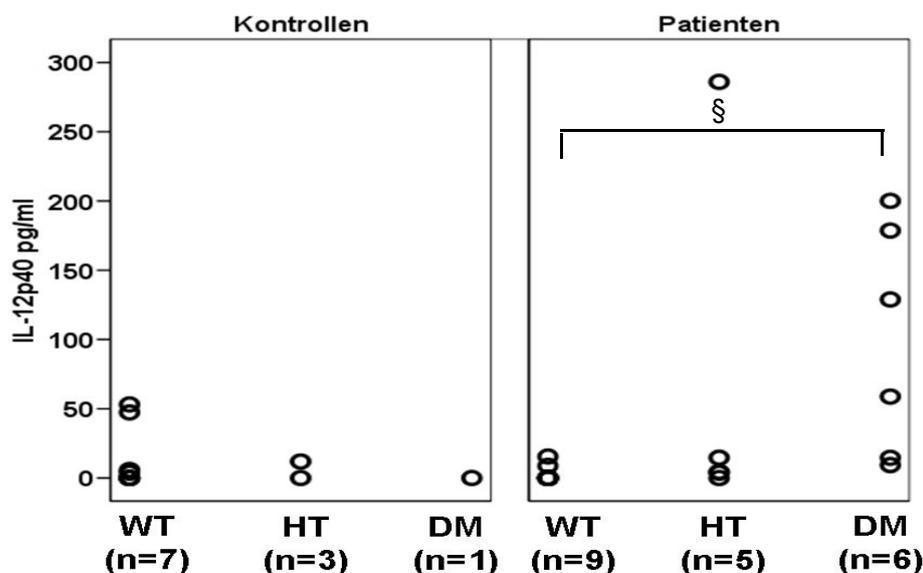


Abbildung 3-7: Basale IL-12p40-Freisetzung durch isolierte Monozyten von Trägern unterschiedlichen NOD2-Genotyps und unterschiedlichen Krankheitsstadien (§ p=0,002)

Als nächster Schritt wurde untersucht, inwieweit die erhöhte basale Ausschüttung von IL-12p40 durch Monozyten von DM-NOD2-Trägern mit einem erhöhten basalen Level von IL-12p40 im Plasma korreliert.

Plasmaspiegel von IL-12p40

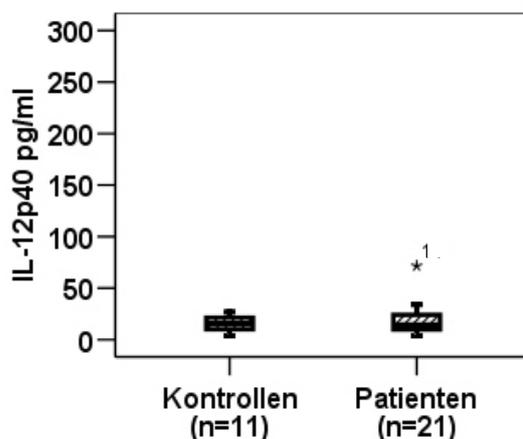
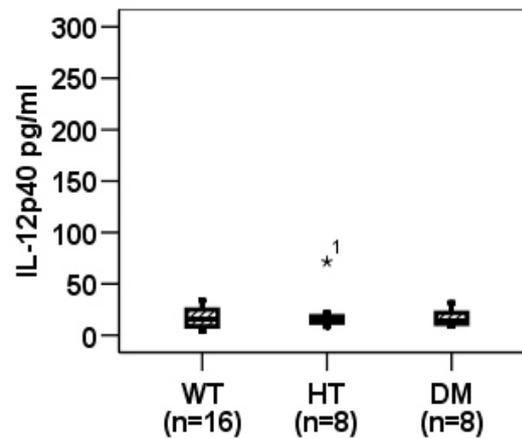


Abbildung 3-8: IL-12p40-Spiegel im Plasma von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen unabhängig vom NOD2-Genotyp (*1 Ausreißer)

Es konnte kein signifikanter Unterschied der IL-12p40-Spiegel zwischen Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen im Blutplasma festgestellt werden (s. Abbildung 3-8).

Die IL-12p40-Plasmaspiegel waren vergleichbar zwischen WT-, HT- und DM-NOD2-Trägern (s. Abbildung 3-9). Außerdem konnte keine Korrelation zwischen den gemessenen IL-12p40-Plasmaspiegeln und der basalen Freisetzung von IL-12p40 durch die isolierten Monozyten festgestellt werden. Weitere regulatorische Mechanismen scheinen daher in vivo vorzuherrschen.

Abbildung 3-9: IL-12p40
Blutplasmaspiegel
abhängig vom *NOD2*-
Genotyp (*1 Ausreißer)



3.2.5 IL-1 β -Freisetzung

Vorausgegangene Studien, welche die Freisetzung von IL-1 β in Abhängigkeit von *NOD2* untersuchten, haben zum Teil gegensätzliche Ergebnisse erzielt. Zum einen wurde eine erhöhte Umsetzung von prä-IL-1 β zu IL-1 β in murinen Zellen mit 1007fs-äquivalentem *NOD2*-Genotyp gezeigt, zum anderen konnte eine geringere Freisetzung von IL-1 β in humanen Zellen mit dem 1007fs-*NOD2*-Genotyp beobachtet werden.

Die IL-1 β -Freisetzung nach MDP-Stimulation ist erhöht bei WT-*NOD2*-Trägern und unverändert bei DM-*NOD2*-Trägern

In dieser Untersuchung wurde die IL-1 β -Freisetzung nach Stimulation mit MDP abhängig vom *NOD2*-Genotyp untersucht. Die Ergebnisse auf Proteinebene, welche Bestandteil dieser Arbeit sind, wurden mit den entsprechenden mRNA-Ergebnissen verglichen (Beynon, 2008).

IL-1 β wurde ebenfalls nach 6h im Zellkulturüberstand mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse waren vergleichbar zu den Ergebnissen in der TNF- α , IL-10 sowie IL-12p40-Untersuchung. Nach Stimulation mit MDP kam es bei Monozyten von WT- wie auch HT-*NOD2*-Individuen zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Ausschüttung (WT: p=0,0016; HT: p=0,0117). Auch hier konnte keine Korrelation zum Krankheitsstatus festgestellt werden. Monozyten von DM-*NOD2*-Trägern hingegen zeigten keinen signifikanten Anstieg der IL1 β -Freisetzung nach Stimulation mit MDP (s.Abbildung 3-10).

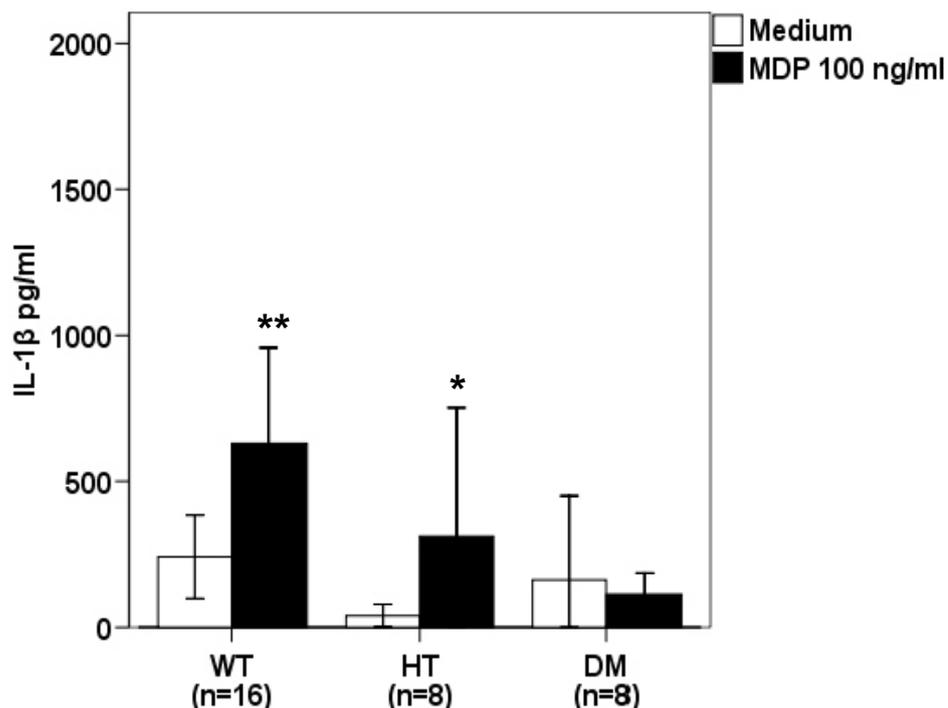


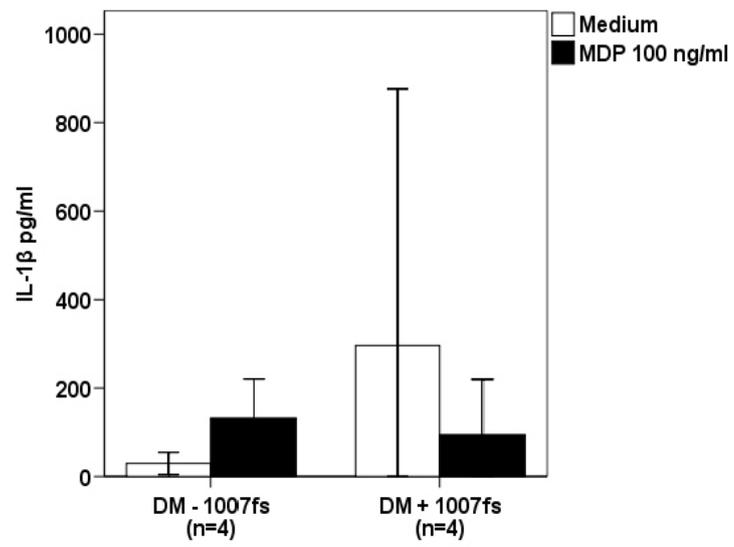
Abbildung 3-10: IL-1 β -Level im Zellkulturüberstand 6h nach MDP-Stimulation von WT-, HT- und DM-NOD2-Monozyten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

Werden die verschiedenen Gruppen miteinander verglichen, so zeigt sich, dass Monozyten von WT-NOD2-Trägern einen signifikant erhöhten absoluten Wert der Freisetzung von IL-1 β nach MDP-Stimulation ($p=0,0324$) wie auch ohne MDP-Stimulation ($p=0,0027$) im Vergleich zu HT-NOD2-Trägern aufweisen. Auch im Vergleich zu Monozyten von DM-NOD2-Trägern zeigen WT-NOD2-Monozyten einen erhöhten absoluten Wert der IL-1 β -Freisetzung nach Stimulation mit MDP ($p=0,013$) wie auch ohne Stimulation mit MDP ($p=0,016$).

Auch für die IL-1 β -Freisetzung wurde der Einfluss der 1007fs-Variante auf die Rezeptorfunktion von NOD2 überprüft. Ähnlich zur IL-10-Untersuchung konnte weder bei DM-NOD2-Trägern noch bei den beiden Untergruppen DM-1007fs und DM+1007fs ein signifikanter Anstieg der IL-1 β -Sekretion nach Stimulation mit MDP gesehen werden. Jedoch zeigt sich auch hier wieder eine leichte Tendenz der erhöhten Sekretion von IL-1 β nach MDP-Stimulation bei den DM-NOD2-Trägern ohne eine 1007fs-NOD2-Variante (s. Abbildung 3-11).

Einfluss der 1007fs-NOD2-Variante auf die IL-1 β -Sekretion

Abbildung 3-11: MDP-induzierte Freisetzung von IL-1 β durch Monozyten von DM-NOD2-Trägern ohne (DM-1007fs) bzw. mit (DM+1007fs) einer 1007fs-NOD2-Variante



3.3 Apoptoseuntersuchungen

3.3.1 Vorbemerkungen

Um einen Einfluss von NOD2 und dessen Mutationen in der Regulation der Apoptose nachzuweisen, wurden die Apoptoseraten unterschiedlicher humaner Zelltypen nach Stimulation mit dem spezifischen NOD2-Liganden MDP untersucht. Es wurden hierfür Zellen von 20 gesunden WT-*NOD2*-Kontrollen und 6 Morbus Crohn-Patienten mit 1007fs-HZ-*NOD2*-Genotyp isoliert.

3.3.2 Verwendung eines Vollblut-Modells

Um Apoptoseuntersuchungen in einem möglichst einflussarmen System untersuchen zu können, wurde zunächst ein Vollblutmodell angewendet. Eine Isolation und Aufreinigung von bestimmten Zellpopulationen geht stets mit einer gewissen Manipulation und Beeinflussung von Stoffwechselaktivitäten dieser Zellen einher. Ein Vollblutmodell ermöglicht es, die Regulation der Apoptose in einem physiologischen System zu untersuchen. Ein Problem jedoch stellten die Granulozyten dar, welche eine hohe Rate spontaner Apoptose aufweisen. Dies führte zu sehr hoher inter- und auch intraindividuellem Variabilität bezüglich der Apoptoseraten und verlangte die Verwendung eines stabileren Systems. Deshalb wurde dazu übergegangen, isolierte Zellpopulationen zu untersuchen.

3.3.3 Einfluß einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von PBMCs

In einem ersten Schritt wurde das Verhalten von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMCs) bei einer Stimulation mit MDP untersucht. Zunächst wurden mittels Ficoll-Zentrifugation PBMCs von Granulozyten und Erythrozyten getrennt, mit verschiedenen Stimuli inkubiert und nach bestimmten Zeitpunkten die Rate der apoptotischen Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Für NOD2 wurde in vorausgegangenen Studien eine NF- κ B-aktivierende Rolle nach Stimulation mit MDP beschrieben, vergleichbar zu der anderer PRRs wie z.B. die membranständigen TLRs. NF- κ B ist in der antiapoptotischen Regulation von Inflammationsprozessen involviert. Deshalb konnte erst nach Inhibition von NF- κ B für TLRs (z.B. TLR4 und TLR2 (Aliprantis, 2001; Ruckdeschel, 2004)) eine proapoptotische Wirkung beobachtet werden. In dieser Untersuchung wurde ebenfalls zunächst NF-

κ B durch Verwendung von NF- κ B-Inaktivatoren ausgeschaltet. Zum einen wurde SN50, ein spezifischer NF- κ B-Inhibitor, und zum anderen MG132, ein Proteasom-Inhibitor mit NF- κ B-hemmenden Eigenschaften, eingesetzt. Die Rate apoptotischer Zellen wurde anhand der durchflusszytometrischen Bestimmung Annexin V-positiver Zellen bestimmt. Da auch nekrotische Zellen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit Annexin V binden können, wurden nekrotische Zellen durch Färbung mit Propidium Iodid (PI) ausgeschlossen. Als apoptotische Zellfraktion wurden Annexin V-positive und gleichzeitig PI-negative Zellen definiert.

Zur Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen wurde zum einen die charakteristische Anordnung der Blutzellen im Forward/Sideward Scatter Streudiagramm ausgenutzt (s. Abbildung 3-12), zum anderen wurden im gleichen Versuchsansatz charakteristische Oberflächenbestandteile der verschiedenen Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt, um darüber eine Unterscheidung möglich zu machen (s. Abbildung 3-13).

Abbildung 3-12: Zellpopulationen im FSC/SSC Streudiagramm; Monozyten und Lymphozyten sind anhand ihrer Größe und ihrer Granularität, welche die Streufähigkeit des Lichtes bestimmt, zu unterscheiden.

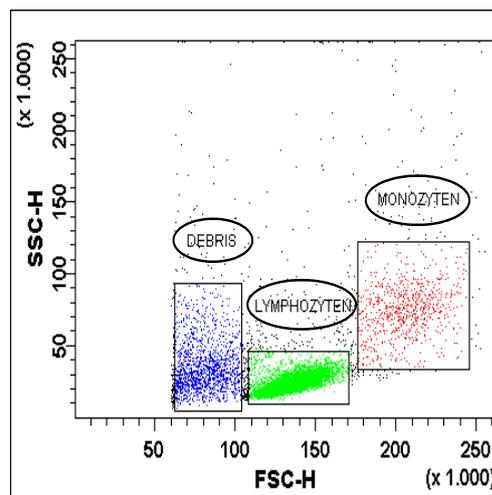
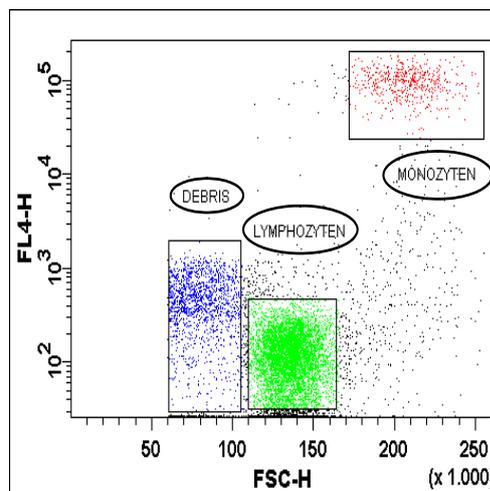


Abbildung 3-13: Durch Färbung der Monozyten mit CD14-APC (FL4-H) kann diese Zellpopulation gesichert als Monozyten identifiziert werden.



Da die Fluoreszenz von PI zwei der vier Filter des FACS Calibur abdeckt und Annexin V-FITC ebenso einen Filter besetzt, konnte für die Oberflächenmarkierung nur ein

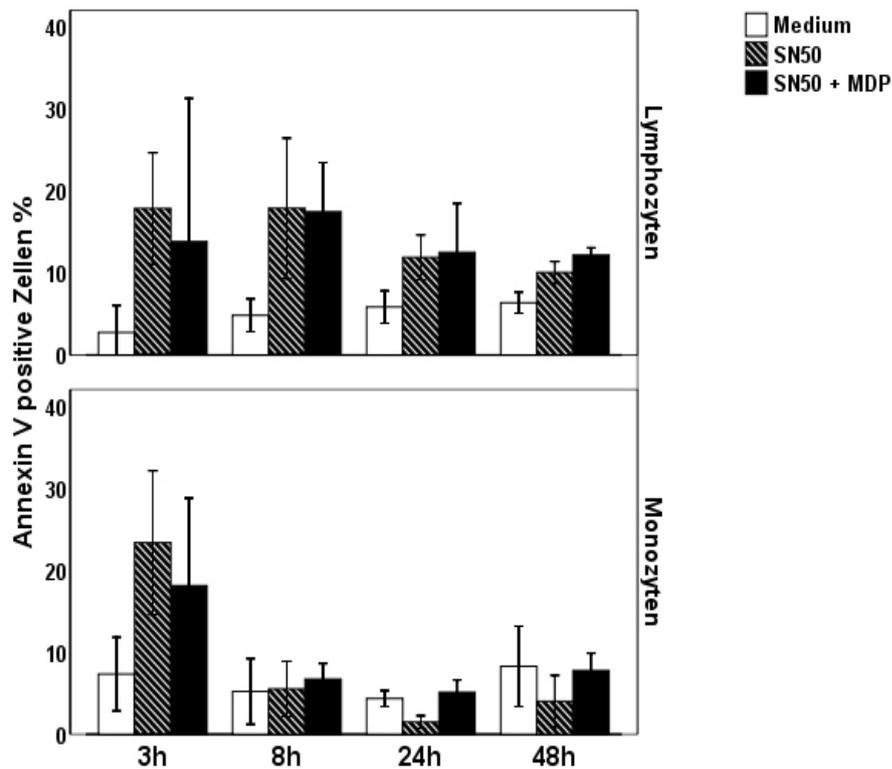
Filter verwendet werden. Da in dieser Untersuchung die Monozyten, welche als Hauptpopulation NOD2 exprimieren, die interessanteste zu untersuchende Fraktion darstellte, wurde beschlossen, diese mit Anti-CD14-Antikörpern zu markieren. Folglich konnten T-Lymphozyten und B-Lymphozyten nicht durch Oberflächenmarker unterschieden werden und wurden deshalb zu einer Gruppe zusammengefasst.

Der Ablauf der Apoptose ist abhängig vom verwendeten Stimulus und vom Zelltyp. Eine Bestimmung der Apoptoserate über verschiedene Zeitpunkte ist demnach notwendig. In dem vorliegenden Versuchsaufbau wurde die Apoptoserate nach 3, 8, 24 und 48 Stunden gemessen, um den optimalen Messzeitpunkt zu bestimmen.

Da die Ergebnisse der TLR-Untersuchungen Anlass zur Annahme geben, dass eine durch NOD2 hervorgerufene Beeinflussung der Apoptoserate vor allem nach Ausschaltung des NF- κ B-Systems zu sehen sein würde, wurde zunächst der Einfluss der MDP-Stimulation unter Hemmung des NF- κ B-Systems untersucht. Zwei verschiedene NF- κ B-Inhibitoren wurden hierfür verwendet. Als erster Inhibitor wurde das Peptid SN50 verwendet, welches spezifisch die Translokation des aktiven NF- κ B-Komplexes in den Zellkern unterbindet. In der vorliegenden Studie konnte eine starke Erhöhung der Apoptoserate nach nur 3 Stunden Inkubation von Monozyten wie auch Lymphozyten mit SN50 beobachtet werden. Ein Unterschied zwischen Zellen, welche mit SN50 alleine, und Zellen, welche mit SN50 und MDP kokubiert wurden, konnte hierbei nicht festgestellt werden (s. Abbildung 3-14).

Untersuchung der Apoptoserate in PBMCs unter Ausschaltung des NF- κ B-Systems

Abbildung 3-14: PBMCs wurden mithilfe von Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und über unterschiedliche Zeiträume mit SN50, mit SN50 plus MDP 100 µg/ml oder mit Medium alleine inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen mit Annexin V-FITC und PI gefärbt und der Anteil Annexin V+/PI- Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Inkubation von PBMCs mit SN50 alleine führt zu einer erhöhten Apoptoserate schon zu sehr frühen Zeitpunkten (n=3 WT-NOD2-Individuen)



Da die starke alleinige Erhöhung der Apoptoserate durch SN50 keine sinnvolle Auswertung einer MDP-induzierten Apoptose möglich machte, musste eine andere Möglichkeit der Ausschaltung des NF- κ B-Systems gefunden werden. Hierfür kam der Proteasomen-Inhibitor MG132 zur Verwendung. Die Inhibition der Aktivierung von NF- κ B erfolgt durch Suppression der I- κ B-Degradation. Hinsichtlich der Beeinflussung von apoptotischen Signalkaskaden wurden in Studien unterschiedliche Effekte beobachtet. Abhängig von Zelllinie und Stimulationsart kann MG132 sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken (Meriin, 1998).

In dieser Studie wurde ein proapoptotischer Effekt auf Monozyten wie auch Lymphozyten festgestellt. Dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant. Die Kostimulation mit MDP führte in WT-NOD2-Zellen (von n= 3 Individuen) tendenziell zu einer Erhöhung der Apoptoserate zu allen untersuchten Zeitpunkten, allerdings ebenfalls ohne dass eine statistische Signifikanz festgestellt werden konnte. Im Gegensatz zu SN50 führte Inkubation mit MG132 alleine jedoch erst nach 24 Stunden zu einer Erhöhung der Apoptoserate (s. Abbildung 3-15).

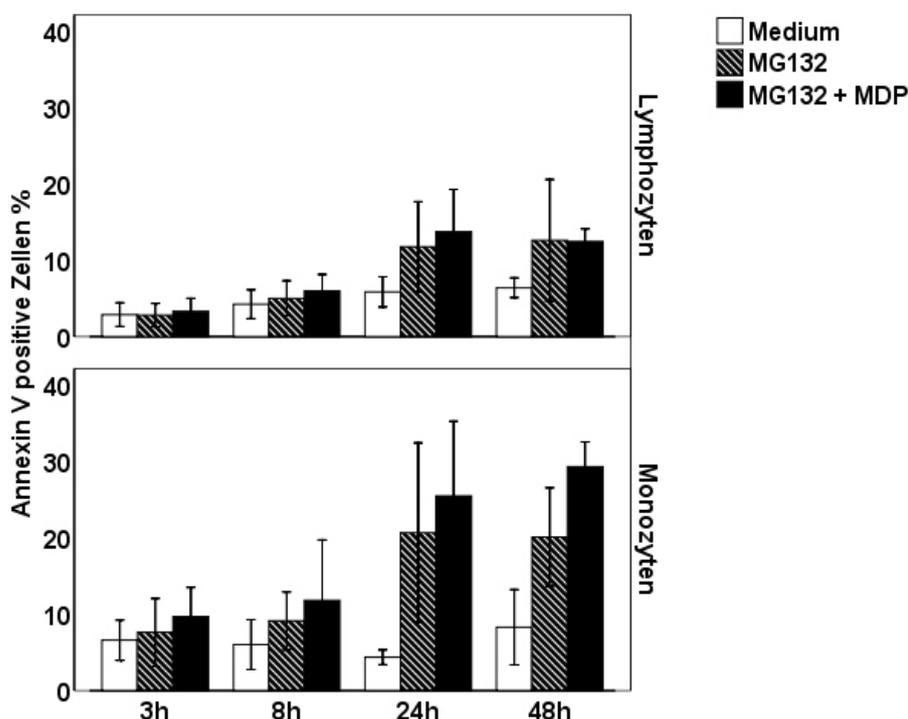


Abbildung 3-15: Isolation und Analyse der Zellen erfolgte analog zur Abb 3-14. Die Inkubation von PBMCs (n=3 WT-NOD2-Individuen) mit MG132 (3 μ M) führte zu einer statistisch nicht signifikant erhöhten Apoptoserate. Die Koinkubation mit MDP führt zu einem weiteren Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen; dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant.

SN50 wie auch MG132 führten selbst schon zu einer erhöhten Apoptoserate in humanen PBMCs. Deshalb scheint die Inhibition der Aktivierung von NF- κ B ein zu stark proapoptotisches Signal für die in dieser Untersuchung verwendeten Zellen darzustellen.

In einem nächsten Schritt wurde nun eine Stimulation mit MDP ohne Präinkubation mit NF- κ B-Inaktivatoren untersucht. Wieder wurden PBMCs aus peripherem Blut mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die isolierten Zellen wurden in *Ultra-Low-Attachment*-Platten für 3, 8, 24 und 48 Stunden in RPMI Medium mit und ohne 100 μ g/ml MDP kultiviert. Nach Färbung mit Annexin V und PI wurden die Zellen wiederholt durchflusszytometrisch analysiert. Die einzelnen Zellfraktionen wurden durch Gaten im Forward/Sideward Scatter und Identifikation durch Oberflächenmarker getrennt untersucht. Ein tendenzieller Anstieg der apoptotischen Zellfraktion wurde in Lymphozyten wie auch in Monozyten zu allen Zeitpunkten erkennbar

Untersuchung der Apoptoserate in PBMCs ohne Ausschaltung des NF- κ B-Systems

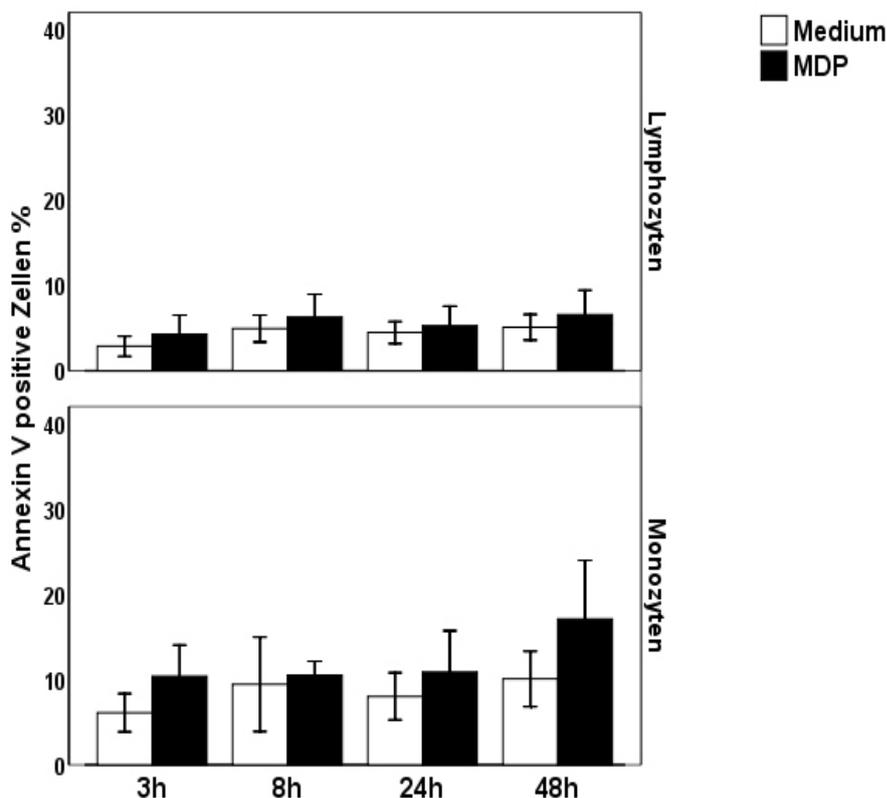
(s.Tab. 3-3). Dieser Effekt war jedoch bei den statistischen Auswertungen nicht

	Monozyten		Lymphozyten	
	Medium	MDP	Medium	MDP
3h	6,1+-2,5%	10,4+-4,1%	2,9+-1,3%	4,3+-2,5%
8h	9,5+-7,8%	10,5+-2,3%	4,9+-2,2%	6,3+-3,8%
24h	8,1+-3,9%	10,9+-6,9%	4,5+-1,8%	5,3+-3,3%
48h	10,1+-4,3%	17,1+-9,1%	5,1+-2,0%	6,6+-3,8%

Tab. 3-3 Rate apoptotischer Monozyten bzw. Lymphozyten nach Stimulation mit 100 µg/ml MDP vs unstimuliert.

signifikant. Bei der getrennten Analyse der zwei Zellpopulationen fällt auf, dass der proapoptische Effekt von MDP in Monozyten stärker ausgeprägt zu sein scheint.

Abbildung 3-16: Isolation und Analyse der Zellen erfolgte analog zu Abb 3-14. Die Stimulation von PBMCs (n=8 WT-NOD2-Individuen) mit MDP führt bei Lymphozyten wie auch bei Monozyten zu einer erhöhten Rate Annexin V-positiver/PI-negativer Zellen (n=8)



Nur ein kleiner Teil der PBMC-Fraktion wird von den Monozyten gestellt (ca. 10-30%). Eine Untersuchung der Apoptoseinduktion durch MDP auf Monozyten in PBMCs könnte so eine geringere Aussagekraft besitzen. Deshalb wurde im nächsten Schritt dazu übergegangen, die PBMCs weiter aufzureinigen und die Populationen getrennt voneinander zu untersuchen.

Dadurch sollte die Frage geklärt werden, inwieweit MDP, der spezifische Ligand für

NOD2, seinen nunmehr angedeuteten proapoptotischen Effekt auf Lymphozyten und Monozyten ausübt und wie stark dieser Effekt in isolierten Zellpopulationen zu beobachten ist. Da NOD2 vor allem in Monozyten exprimiert wird, nicht aber in Lymphozyten, besteht weiterhin Anlass zur Annahme, dass ein proapoptotischer Effekt am ehesten in Monozyten zu sehen wäre und dass ein möglicher Effekt in Lymphozyten durch Monozyten vermittelt sein könnte.

3.3.4 Einfluss einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von Monozyten

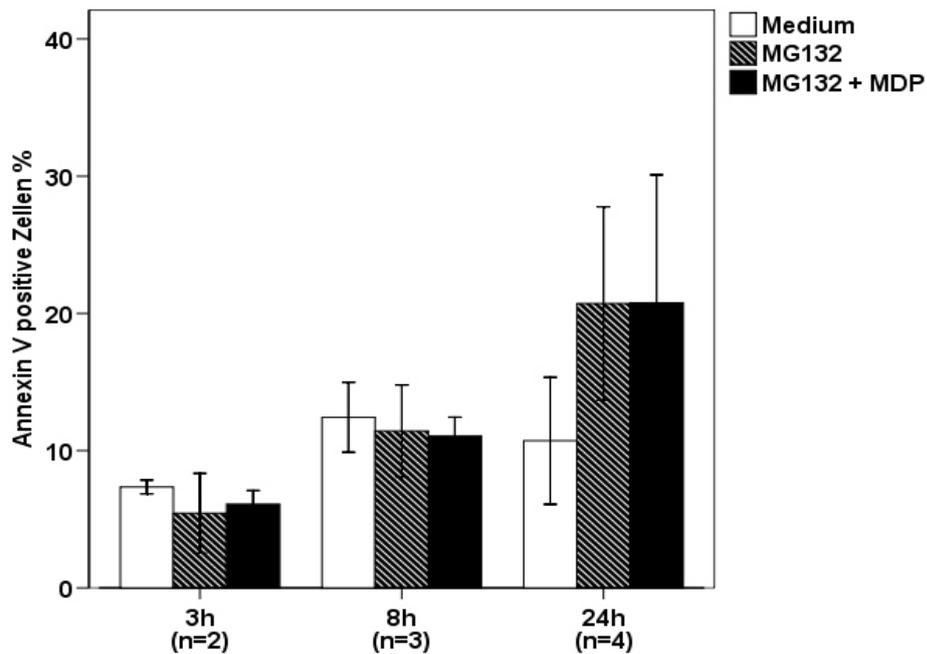
Für diesen Versuch wurden Monozyten nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation mittels magnetisch markierter Anti-CD14-Antikörper und anschließender positiver Isolation in einer magnetischen Säule aufgereinigt (s. Kapitel 2.2.3). Die dadurch negativ isolierten Lymphozyten wurden in einem separaten Gefäß aufgefangen und ebenso für Apoptoseversuche weiter verwendet.

Da die Färbung mit Annexin V zur Messung der Apoptoserate sehr störanfällig sein kann, wurde ein Protokoll erstellt, welches eine geringstmögliche Manipulation der Zellen erlaubte. Monozyten können sehr schnell auf geeignete Oberflächen adhären. Deshalb würde eine Behandlung mit Trypsin-EDTA oder ein „Abkratzen“ dieser Zellen mit geeigneten Hilfsmitteln benötigt werden, um diese Zellen wieder in Suspension zu bringen. Zur Messung im Durchflusszytometer ist eine Suspension der zu messenden Zellen obligat. Für die stark adhätierenden Monozyten wurde in diesem Versuchsablauf *Ultra-Low-Attachment-Zellkulturplatten* verwendet, welche eine kovalent gebundene Hydrogelschicht besitzen, Proteinadsorption, Enzym- und Zellaktivierung minimieren und damit die Adhärenz von Zellen verhindern können. Dies machte eine Prozedur zur Ablösung der Zellen obsolet.

Auch in diesem Versuchsaufbau wurde zunächst der Effekt von MDP auf Monozyten nach Ausschaltung des NF- κ B-Systems untersucht. Als NF- κ B Inhibitor wurde MG132 verwendet, da dieser Proteasomen-Inhibitor einen geringeren intrinsischen proapoptotischen Effekt in PBMCs aufgewiesen hatte.

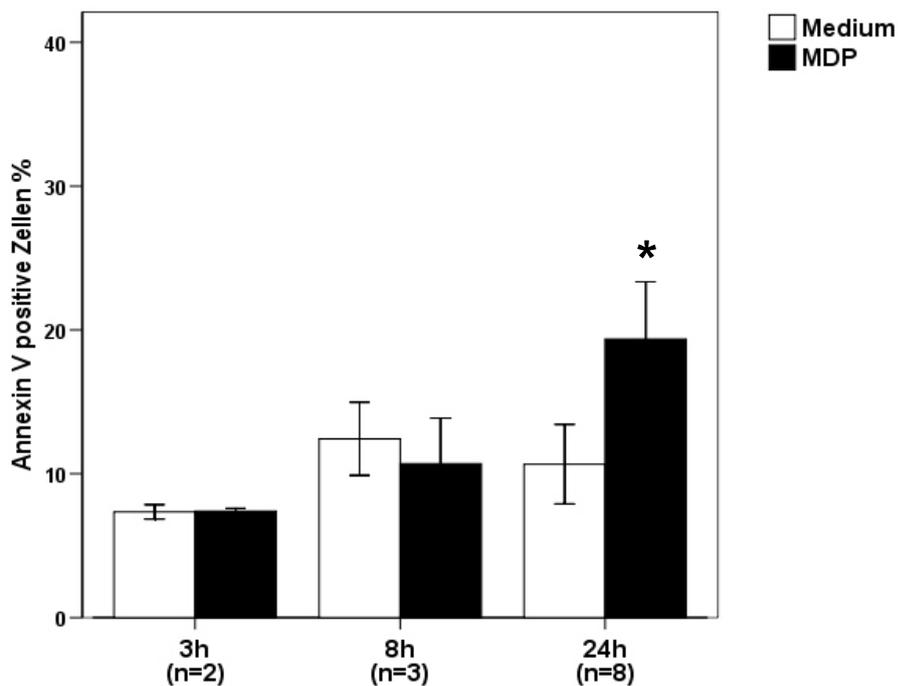
Erkennbar war, vergleichbar zu den Ergebnissen in den PBMCs, ein proapoptotischer Effekt von MG132 nach 24 Stunden. Dieser Effekt war allerdings statistisch nicht signifikant. Eine zusätzliche Stimulation mit MDP induzierte keinen Anstieg der apoptotischen Fraktion von Monozyten (s. Abbildung 3-17).

Abbildung 3-17: Isolation von Monozyten erfolgte mittels MACS-Aufreinigung nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, Analyse der Zellen erfolgte analog zu Abb 3-14. Die Präinkubation von Monozyten (WT-NOD2) mit MG132 (3 μ M) führte nach 24h zu einer Erhöhung der Apoptoserate bei Monozyten. Die gleichzeitige Zugabe von MDP verursachte keine zusätzliche Augmentierung dieses Prozesses.



Da die Experimente an PBMCs ergeben hatten, dass MDP alleine ohne vorherige Blockade des NF- κ B-Systems eine leichte Erhöhung der Apoptoserate induzieren kann, wurde der Effekt der MDP-Behandlung auch auf isolierte Monozyten untersucht. Nach 3 und 8 Stunden war kein proapoptotischer Effekt von MDP auf Monozyten erkennbar. Eine Inkubation von MDP für 24 Stunden hingegen führte zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate ($p=0,012$).

Abbildung 3-18: Die Inkubation von WT-NOD2-Monozyten mit MDP führte nach 24h zu einer erhöhten Apoptoserate (* $p<0,05$)



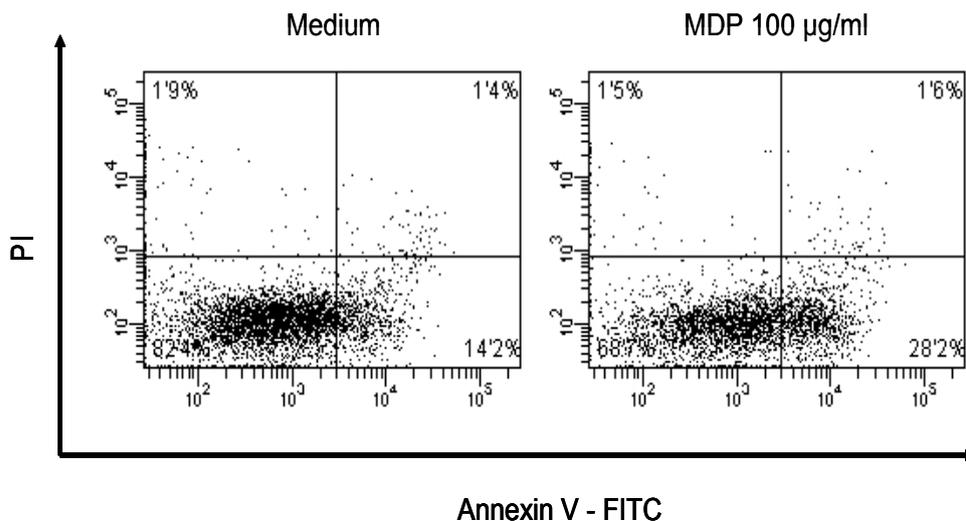


Abbildung 3-19: Repräsentative FACS-Bilder von Monozyten einer WT-NOD2 gesunden Kontrollperson nach Inkubation mit Medium oder MDP 100 µg/ml für 24h und Färbung mit Annexin V / PI

Deutlich ist eine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zu unstimulierten Monozyten zu erkennen ($10,7 \pm 3,9\%$ vs. $19,4 \pm 5,6\%$; $p=0,012$). Da die Stimulation der Monozyten mit unphysiologisch hoher MDP-Konzentration (100 µg/ml) durchgeführt worden war, wurde eine Austitration vorgenommen. Es galt zu klären, ob auch geringere Konzentrationen von MDP einen proapoptotischen Effekt aufweisen oder ob der proapoptotische Effekt durch einen unspezifischen toxischen Effekt hoher Dosen von MDP zu erklären ist.

MDP induziert Apoptose in Monozyten mit WT-NOD2-Genotyp

Hierfür wurden Monozyten von sechs der acht gesunden WT NOD2 Kontrollen zusätzlich zu 100 µg/ml auch mit 1 µg/ml und 100 ng/ml MDP stimuliert. Auch bei Stimulation mit 100 ng/ml war eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate zu messen.

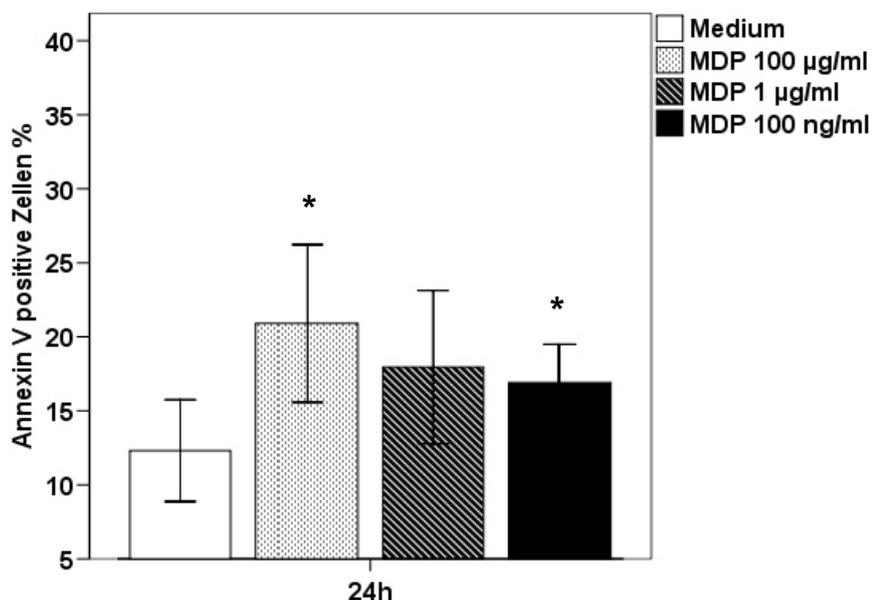


Abbildung 3-20: Austitration des proapoptotischen Effekts von MDP (* $p<0,05$), Medium $n=8$, MDP100 µg/ml $n=8$; MDP 1 µg/ml $n=6$; MDP 100 ng/ml $n=6$

Da auch niedrige Dosen von MDP (100 ng/ml) zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate führten, ist ein unspezifischer Effekt von MDP unwahrscheinlich.

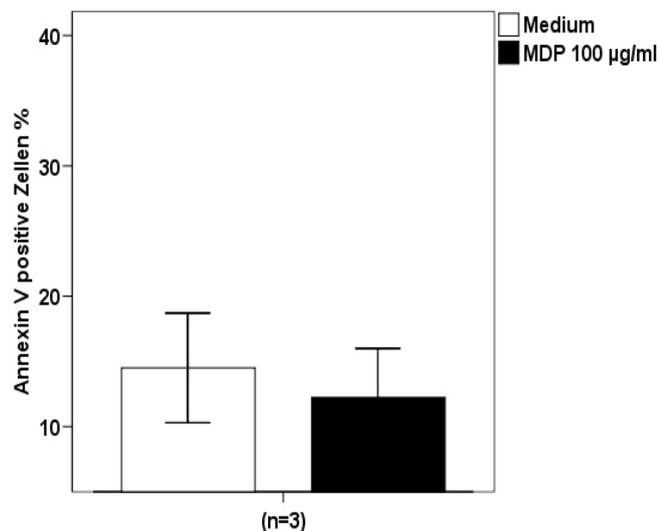
Kein Unterschied der Apoptoserate konnte bei Anwendung positiver oder negativer Zellisolation festgestellt werden

Es stellte sich außerdem die Frage, ob die Isolationsmethode einen Einfluss auf die Ergebnisse der Apoptoseuntersuchungen hat. Eine erhöhte Apoptoserate ausgelöst durch positive Isolation der Monozyten konnte jedoch durch vergleichende Versuche ausgeschlossen werden. Monozyten, welche durch Depletion gewonnen wurden, zeigten das gleiche Verhalten in Apoptoseversuchen.

Kultivierung in Standardplatten zeigte im Gegensatz zu den Ultra-Low Attachment-Platten keine MDP-induzierte Erhöhung der Apoptoserate

Wie oben erwähnt, wurden die an den Monozyten durchgeführten Untersuchungen auf Platten vorgenommen, welche eine Adhärenz der Zellen verhindern. Zum Vergleich wurden Standardplatten verwendet, welche eine Adhärenz der Monozyten ermöglichen. Die Monozyten wurden auf gleiche Weise (s.o.) isoliert. Nach Kultivierung in Standardplatten über 24 Stunden in RPMI-Medium alleine oder mit 100 µg/ml MDP wurden die Zellen durch Trypsinierung in Suspension gebracht. Auch der Zellkulturüberstand wurde zur Zellsuspension hinzugefügt, um einen Verlust von apoptotischen Zellen, welche ihre Adhärenzfähigkeit verlieren können, zu vermeiden. Die so gewonnenen Zellen wurden mit Annexin V und PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Stimulation mit MDP war bei Kultivierung der Monozyten in Standardplatten keine erhöhte Apoptoseinduktion zu erkennen. Somit war ein klarer Unterschied im Vergleich zu den Zellen, bei welchen eine Adhärenz mittels Verwendung von *Ultra-Low-Attachment*-Platten verhindert wurde, zu erkennen.

Abbildung 3-21: Bei Kultivierung von WT- NOD2-Monozyten in Standardplatten kam es nicht zu einem Anstieg der Rate apoptotischer Zellen nach Stimulation mit MDP



3.3 Apoptoseuntersuchungen

Durch die Versuche an Monozyten von WT-*NOD2*-Individuen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit MDP zu einer erhöhten Apoptoserate der Monozyten führt. Ob dieser Effekt wirklich von *NOD2* abhängt, ist jedoch damit alleine nicht bewiesen. Um dies klären zu können, wurden für dieselben Untersuchungen Monozyten von 1007fs-*NOD2*-homozygoten Individuen herangezogen. Da durch Zytokinuntersuchungen in der vorliegenden, wie auch in anderen Studien, gezeigt werden konnte, dass die 1007fs-*NOD2*-Variante zu einem Verlust einer Antwort auf MDP führt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dies auch bei der Apoptoseregulation der Fall sein könnte.

Monozyten von 1007fs-homozygoten Individuen wurden analog zu den Monozyten der WT-*NOD2*-Individuen isoliert und 24 Stunden mit 100 µg/ml MDP in *Ultra-Low-Attachment*-Platten inkubiert. Nach dem Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen entnommen, mit Annexin V und PI gefärbt und schließlich durchflusszytometrisch untersucht. Die Inkubation von Monozyten 1007fs-homozygoter Morbus Crohn-Patienten mit MDP führte nicht zu einer verstärkten Induktion von Apoptose im Vergleich zur Inkubation mit Medium alleine. Zur Apoptoseinduktion durch MDP scheint somit ein intaktes *NOD2*-Protein vorliegen zu müssen.

MDP-Stimulation von Monozyten 1007fs-homozygoter Träger

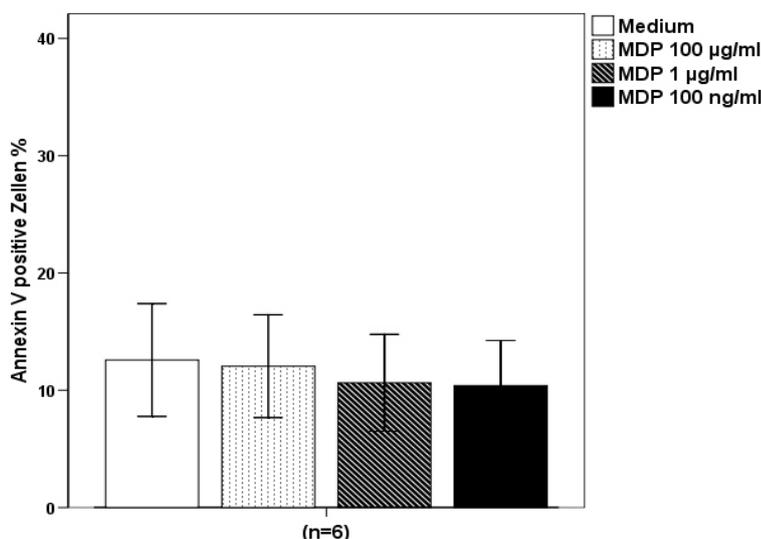


Abbildung 3-22: MDP-Inkubation von Monozyten 1007fs-*NOD2*-homozygoter Morbus Crohn-Patienten führte nicht zu einer erhöhten Apoptoserate

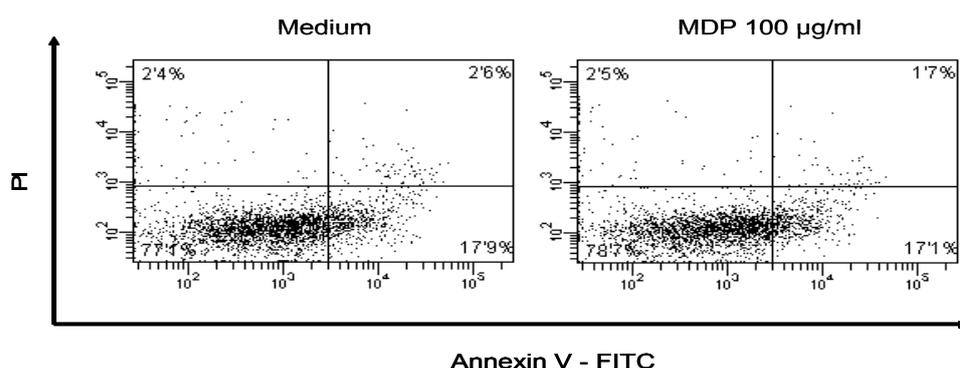
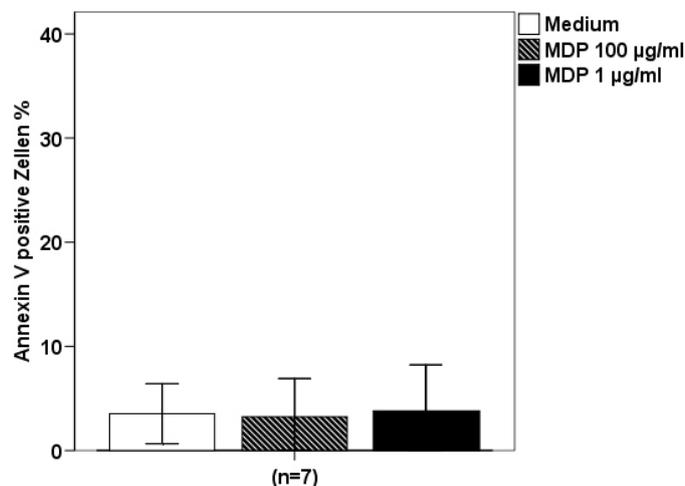


Abbildung 3-23: Repräsentative FACS-Bilder eines 1007fs-*NOD2*-homozygoten Morbus Crohn-Patienten nach Inkubation mit Medium oder MDP 100 µg/ml für 24h und Färbung mit Annexin V / PI

3.3.5 Einfluss einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von Lymphozyten

Die Untersuchungen an PBMCs ergaben für Lymphozyten eine tendenzielle Erhöhung der Apoptoserate nach Stimulation mit MDP. Da dies jedoch nicht statistisch signifikant war und zudem diese Ergebnisse in Kontakt zu Monozyten entstanden sind, wurde auch für Lymphozyten eine getrennte Untersuchung der Apoptoserate nach Stimulation mit MDP durchgeführt. Die Lymphozyten wurden durch negative Isolation nach Markierung der Monozyten mit Anti-CD14 magnetischen Beads gewonnen, in *Ultra-Low-Attachment*-Platten mit 1 bzw. 100 µg/ml MDP oder Medium alleine inkubiert und nach Ablauf von 24 Stunden mit Annexin V und PI gefärbt.

Abbildung 3-24: Lymphozyten wurden mithilfe von MACS-Isolation nach Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert, die Analyse der Zellen erfolgte analog zu Abb 3-14. Die Inkubation mit MDP über 24h führte nicht zu einer erhöhten Apoptoserate in Lymphozyten von WT-NOD2-Trägern



MDP induziert keine Apoptose in Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Nach der durchflusszytometrischen Untersuchung konnte weder bei WT- noch bei 1007fs-homozygoten *NOD2*-Trägern eine Erhöhung der Apoptoserate nach Behandlung mit MDP beobachtet werden. B-Lymphozyten und T-Lymphozyten wurden durch Anfärbung mit Anti-CD3-Antikörpern, welche spezifisch an T-Lymphozyten binden, separat betrachtet. Weder B- noch T-Lymphozyten zeigten eine erhöhte Apoptoserate nach Stimulation mit MDP, nicht überraschend, da Lymphozyten *NOD2* nicht exprimieren. Interessanterweise zeigten Lymphozyten, welche mit Monozyten koinkubiert wurden eine leichte aber nicht signifikante Steigerung der Apoptoserate nach Stimulation mit MDP (s.o.). Da dies auf eine Interaktion der Monozyten mit den Lymphozyten hindeutet, wurden Lymphozyten mit dem Überstand von Monozyten inkubiert, welche mit MDP für 24h stimuliert worden sind und nach einer weiteren Inkubation von 8 bzw. 24h auf ihre Annexin V-Bindung untersucht.

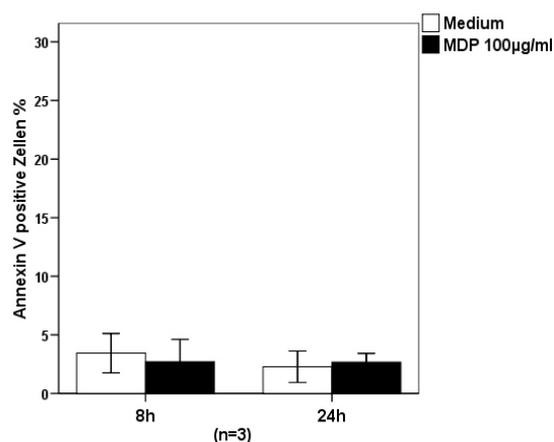


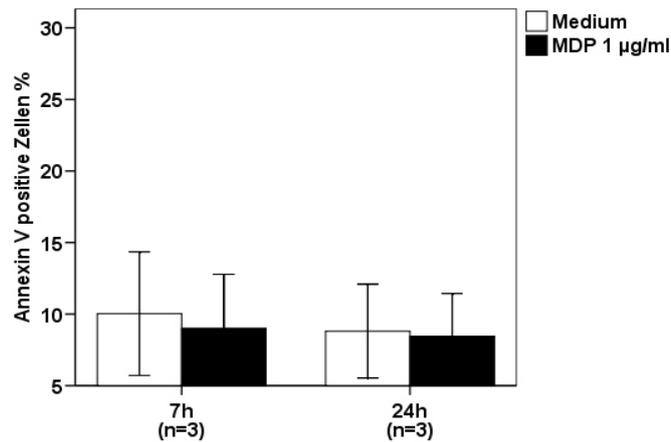
Abbildung 3-25: Die Inkubation von WT-NOD2-Lymphozyten über 8h bzw. 24h mit Überstand von mit MDP stimulierten WT-NOD2-Monozyten führte nicht zu einer Apoptoseinduktion

Nach Inkubation mit diesem Überstand konnte ebenso keine erhöhte Apoptoserate der Lymphozyten festgestellt werden.

3.3.6 Einfluss einer MDP-Behandlung auf die Apoptose von LPMCs

Beim Morbus Crohn sind vor allem mononukleäre Zellen in der Lamina propria (LPMCs) an der Aufrechterhaltung der Entzündung beteiligt. Eine erniedrigte Apoptoserate der LPMCs wurde als bedeutender Faktor in der Pathogenese des Morbus Crohn postuliert. Deshalb wurde auch in diesen Zellen die Fähigkeit von MDP Apoptose zu induzieren, untersucht. LPMCs wurden aus Biopsien von gesunden Kontrollen gewonnen, in RPMI-Medium mit und ohne MDP inkubiert, nach Ablauf der Inkubation mit Annexin V und PI gefärbt und schließlich durchflusszytometrisch untersucht. Da bei isolierten Monozyten schon 1 µg/ml zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate führte, wurde zur Stimulation der LPMCs diese Konzentration gewählt, da dies die physiologische Situation im Darm eher widerspiegelt.

Abbildung 3-26: Die Isolation der LPMCs wurde durch enzymatischen Verdau von Darmbiopsien durchgeführt, die Analyse der Zellen erfolgte analog zu Abb 3-14. Die Inkubation von LPMCs mit MDP über 7h bzw. 24h führt nicht zu einer erhöhten Apoptoserate



MDP induziert keine Apoptose in LPMCs

Stimulation mit MDP führte bei LPMCs von gesunden Kontrollen nicht zu einer Induktion von Apoptose. Da eine weitere Aufreinigung der Zellen aufgrund geringer Zellausbeute aus den Biopsien nicht möglich war, wurde darauf verzichtet. Anstatt dessen wurden die T-Lymphozyten mittels Anti-CD3-Antikörper angefärbt und im Durchflusszytometer identifiziert und isoliert betrachtet. Doch auch bei T-Lymphozyten konnte keine Erhöhung der Apoptoserate festgestellt werden.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der funktionellen Relevanz Morbus Crohn-assoziiierter NOD2-Mutationen. Hierbei wurden zwei wichtige in der Pathogenese des Morbus Crohn implizierte Signalkaskaden herangezogen.

Zum einen wurde die Regulation der Zytokinproduktion im angeborenen Immunsystem und die Auswirkungen der NOD2-Mutationen untersucht, zum anderen wurde die physiologische Rolle von NOD2 in der Apoptoseregulation und der Einfluß der NOD2-Mutationen betrachtet. Hinsichtlich der Zytokinproduktion gibt es in der Literatur kontroverse Diskussionen; die vorliegende Studie soll deshalb zu einem besseren Verständnis dieser Regulation führen. Apoptoseregulation durch NOD2 wurde bis heute in keiner Studie gezeigt, einzig Indizien weisen auf einen möglichen Zusammenhang hin. Der Nachweis eines Zusammenhanges könnte somit ein neues Pathogenesemodell von NOD2-Mutationen beim Morbus Crohn darstellen.

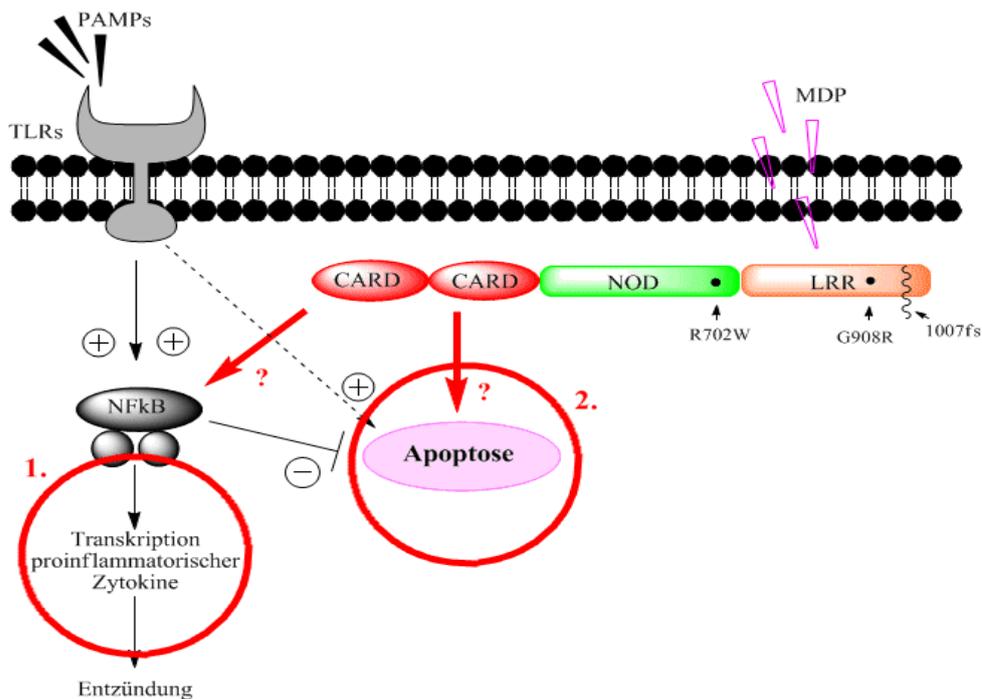


Abbildung 4-1: Darstellung der untersuchten Signalkaskaden. 1. Regulation der Zytokinproduktion; 2. Apoptoseregulation

4.1 Diskussion der Zytokinerggebnisse

Morbus Crohn ist eine vorwiegend T_H1 - und T_H17 -vermittelte CED, welche durch eine erhöhte Aktivierung von NF- κ B und überschießende Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in den erkrankten Darmabschnitten charakterisiert ist (Schreiber, 1998). Viele der antientzündlichen Medikamente, welche beim Morbus Crohn verwendet werden, inhibieren die Aktivierung von NF- κ B, eine Tatsache welche diesen Faktor als einen der Haupteffektoren der Pathogenese vermuten lässt (Podolsky, 2002). Diese Befunde waren Grundlage zur Annahme, dass Morbus Crohn-assoziierte Genmutationen zu einer erhöhten Aktivierung von NF- κ B und somit zu einer erhöhten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine oder zu einer verringerten Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine führen müssten (Hanauer, 2006). MDP als spezifischer Ligand für NOD2 führt zur Sekretion von Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-8. Auch wurde in mehreren Studien gezeigt, dass MDP die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β induzieren kann (Kramer, 2006; Netea, 2005b; Netea, 2004). Im Falle der 1007fs-Mutation des NOD2 kommt es aufgrund eines verkürzten Proteins zu einer verringerten Freisetzung von sowohl proinflammatorischen wie auch antiinflammatorischen Zytokinen nach Stimulation mit MDP (Li, 2004; Netea, 2005a). Die Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Mutationen scheinen somit *loss of function* oder "Funktionsverlust"-Mutationen zu sein. Eine defekte NOD2-Antwort scheint zu einer defekten initialen Immunantwort mit konsekutiv herabgesetzter Abwehr gegen pathogene Organismen zu führen (van Heel, 2005). Möglicherweise können dadurch diese pathogenen Organismen in die Mukosa einwandern und dort eine Entzündung auslösen.

Die Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Mutationen führen zu einer verringerten MDP-induzierten Ausschüttung von TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-12p40

Die vorliegende Arbeit unterstützt die zuvor durchgeführten Studien und erweitert diese insofern, als dass der Einfluss auch der beiden anderen Mutationen auf die Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-12p40 und IL-10 bestimmt wurde.

Für TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-12p40 wurde eine verringerte MDP-induzierte Freisetzung in Monozyten von Doppelmutationsträgern im Vergleich zu Monozyten von WT- oder HT-*NOD2*-Trägern festgestellt. Auch Doppelmutationsträger der beiden anderen Mutationsvarianten R702W und G908R zeigten eine verringerte Sekretion von TNF- α nach Stimulation mit MDP verglichen zu WT- und HT-*NOD2*-Trägern.

Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Existenz mindestens einer 1007fs-Variante bei Trägern von zwei mutierten *NOD2*-Allelen ausschlaggebend ist. Bei Vorhandensein einer 1007fs-Variante ist keine Antwort auf eine Stimulation mit MDP zu verzeichnen, also keine Induktion einer Zytokinfreisetzung. Ist diese Mutation nicht vorhanden, handelt es sich also um G908R- oder R702W-homozygote Träger oder G908R/R702W-compound-heterozygote Träger, führt MDP-Stimulation zu einer verringerten, aber dennoch messbaren Freisetzung von Zytokinen. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit den Ergebnissen von Studien in mit *NOD2*-Varianten transfizierten Zelllinien, welche auf Stimulation mit PGN eine reduzierte NF- κ B Aktivierung bei der R702W- und der G908R-Variante und keine Aktivierung bei der 1007fs-Variante zeigen konnten (Bonen, 2003b). Auch unterstützen diese Ergebnisse klinische Beobachtungen, die ein gravierenderes Krankheitsbild in Patienten mit der 1007fs-Variante gezeigt haben (Seiderer, 2006a; Seiderer, 2006b). Damit konnte die stärkere Auswirkung der 1007fs-Variante neben *in vitro* und klinischen Beobachtungen auch in einem humanen *ex vivo* Modell bestätigt werden. Morbus Crohn-Patienten, welche compound-heterozygot oder homozygot für eine der beiden anderen Mutationen sind, scheinen von diesen Mutationen in einem geringeren Maße beeinflusst zu sein. Dies könnte möglicherweise in der Zukunft neben prognostischen Möglichkeiten auch therapeutische Konsequenzen haben.

Das Vorliegen einer 1007fs-NOD2-Variante ist ausreichend für einen vollständigen Verlust der Rezeptorfunktion in Individuen mit zwei mutierten NOD2-Allelen

Eine fehlende Induktion der IL-1 β -Freisetzung nach Stimulation mit MDP bei Vorhandensein von zwei mutierten *NOD2*-Allelen wurde in dieser Arbeit nachgewiesen. Die mRNA Ergebnisse, welche in diesen Zellen generiert wurden, spiegelten die Ergebnisse auf Proteinebene wider (Beynon, 2008). Nach Stimulation mit MDP kam es somit nicht nur zu verringerter mRNA-Expression von IL-1 β , sondern auch zu einer verringerten Freisetzung des Proteins. Dies steht in Kontrast mit Beobachtungen von Maeda et al (Maeda, 2005), welche in ihrer Studie zeigen konnten, dass Zellen von *knock-in*-Mäusen, welche eine 1007fs-äquivalente Mutation von *NOD2* tragen, nach Stimulation mit MDP eine erhöhte Sekretion von IL-1 β aufweisen. Makrophagen von transgenen Mäusen (1007fs-äquivalentes *NOD2*) und WT-Mäusen wurden für diese Studie mit MDP oder LPS inkubiert. Weder bei den WT-*NOD2*-Zellen noch bei den mutationstragenden Zellen kam es nach Inkubation mit LPS zu einer Ausschüttung von IL-1 β . Bei Inkubation mit MDP kam es nur bei den mutationstragenden Zellen zu einer erhöhten Sekretion von IL-1 β . Die Sekretion von reifem IL-1 β setzt eine posttranslationelle Modifikation mittels Caspase-1 voraus. Bei der Inkubation mit LPS kam es nur zu einer Expression von prä-IL-1 β . Das mutierte *NOD2*-Protein scheint dabei eine besondere Affinität zur Caspase-1 zu besitzen und

Die IL-1 β -Sekretion nach Stimulation mit MDP ist verringert bei Vorhandensein von zwei mutierten NOD2-Allelen

diese dadurch zu aktivieren. Somit kam es bei dem mutierten Protein auch zur erhöhten Freisetzung von maturem IL-1 β . Dies stellte für die Autoren der Studie ein zweites mögliches Erklärungsmodell für die Relevanz der NOD2-Mutationen in der Pathogenese des Morbus Crohn dar. Die Autoren postulierten anhand der erhöhten IL-1 β -Sekretion bei Vorhandensein von NOD2-Mutationen die sogenannte Theorie der *gain of function* (Funktionszugewinn). In der vorliegenden Studie konnte diese Theorie nicht bestätigt werden. 1007fs-homozygote Monozyten reagierten nicht mit einer erhöhten Sekretion von IL-1 β nach MDP-Stimulation, sondern - im Gegenteil - mit einer schwächeren Sekretion von IL-1 β . Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz besteht darin, dass in der vorliegenden Studie humane Zellen verwendet wurden und kein murines Modell. Die Daten der vorliegenden Arbeit werden durch vorhergehende Untersuchungen unterstützt, welche in humanen Systemen vergleichbare Ergebnisse erzielt hatten (Li, 2004; Netea, 2004). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass das murine und humane angeborene Immunsystem in manchen Aspekten nicht vergleichbar sind (Rehli, 2002). So konnte gezeigt werden, dass NOD2 *knock-out* Mäuse spontan keine Kolitis entwickeln (Pauleau, 2003) und nur nach intragastrischer Belastung mit bestimmten Bakterien eine Entzündung des Darms hervorgerufen werden kann (Kobayashi, 2005).

Monozyten mit zwei mutierten NOD2-Allelen weisen erhöhte basale Spiegel von IL-12p40 auf

Besonders interessant in dieser Studie waren die Ergebnisse bezüglich der Ausschüttung von IL-12p40. Analog zu den zuvor beschriebenen Zytokinen wurde bei Monozyten von Doppelmutationsträgern eine verringerte bzw. eine aufgehobene Induktion von IL-12p40-mRNA-Expression bzw. Zytokinsekretion beobachtet. Eine unerwartete Beobachtung war, dass bei Zellen von Doppelmutationsträgern eine erhöhte basale Ausschüttung von IL-12p40 im Vergleich zu NOD2-WT-Patienten und Kontrollen bestand. Bei Inkubation der Monozyten in Medium ohne Stimulus bestand also eine erhöhte Sekretion von IL-12p40, welche durch Stimulation mit MDP nicht weiter anstieg. Dies stand im Kontrast zur Situation in NOD2-WT- und HT-Individuen, welche einen niedrigen basalen Spiegel an IL-12p40 aufwiesen und einen Anstieg nach MDP-Stimulation.

Es kann also angenommen werden, dass ein von MDP unabhängiger, durch NOD2 beeinflusster Mechanismus die Freisetzung von IL-12p40-abhängigen Proteinen reguliert. Entweder führt das Vorhandensein von Mutationen im NOD2-Allel zu einer erhöhten Freisetzung von IL-12p40 im Sinne einer *gain of function*, oder aber das WT-NOD2 fungiert unter normalen Umständen als negativer Regulator der IL-12p40-Sekretion, eine Funktion, welche im Falle einer Mutation verloren gegangen sein kann. Diese Erklärung wird durch Studien unterstützt, welche *in vitro* (Watanabe, 2004) und kürzlich auch *in vivo* (Yang, 2007) in einem murinen System durchgeführt

worden sind. Darin wurde eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung und erhöhte IL-12p40-Freisetzung in NOD2-negativen Zellen, welche mit PGN stimuliert wurden, beobachtet. Auch wurde eine Resistenz gegenüber einer Induktion einer Kolitis durch TNBS bei Überexpression von NOD2 beschrieben. Eine weitere kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt außerdem eine durch kontinuierliche NOD2-Stimulation induzierte Toleranz gegenüber bakteriellen Bestandteilen (Hedl, 2007). Dies würde auch erklären, warum der einzig gesunde Doppelmutationsträger keine erhöhte basale Ausschüttung von IL-12p40 aufwies. Möglicherweise kam es in diesem gesunden *NOD2*-Doppelmutationsträger, ohne vorausgehenden Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen im nicht entzündeten Darm, nicht zur nötigen Stimulation. Die Beobachtung, dass die basale Freisetzung von IL-12p40 in Monozyten von Morbus Crohn-Patienten mit zwei mutierten *NOD2*-Allelen erhöht ist, stellt möglicherweise eine wichtige pathogenetische Verbindung zu Morbus Crohn dar. Die Hochregulation IL-12p40-assoziiierter Proteine scheint ein wichtiger Faktor in der Genese von Morbus Crohn zu sein (Manetti, 1993; Trinchieri, 2003). In Morbus Crohn-Patienten wurde eine erhöhte Konzentration von IL-12p40 in der Lamina propria gemessen (Monteleone, 1997). Auch wurde in dem terminalen Ileum von Mäusen, welche unter normalen Bedingungen gehalten wurden, eine höhere Expression von IL-12p40 gemessen als in Mäusen, welche unter keimfreier Umgebung aufgewachsen sind (Becker, 2003). IL-12p40 heterodimerisiert mit der Untereinheit p35 um IL-12 zu bilden, aber auch mit der Untereinheit p19 um IL-23 zu bilden (Parham, 2002). Beide Zytokine werden vornehmlich von den *NOD2*-exprimierenden Makrophagen und dendritischen Zellen nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen sezerniert (Trinchieri, 2003). Bis vor kurzem wurde die Hochregulation von IL-12p40 vor allem in Zusammenhang mit erhöhten IL-12-Spiegeln und konsekutiver Verschiebung des Immunsystems in Richtung einer T_H1 -dominierter Immunantwort gesehen. Behandlung mit Antikörpern gegen IL-12p40 führte bei Mäusen mit Kolitis zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes (Neurath, 1995). Die Behandlung mit Antikörpern gegen IL-12p35 führte jedoch nicht zu einer Verbesserung. Im Gegensatz hierzu war auch der Einsatz von Antikörpern gegen IL-23p19 erfolgreich, es wurden jedoch gravierende Nebenwirkungen verzeichnet. Dies legt die Vermutung nahe, dass IL-23 und nicht IL-12, wie zuvor angenommen, eine stärkere pathogenetische Relevanz beim Morbus Crohn aufweist. IL-23-Sekretion führt zu einer T_H17 -gewichteten Immunantwort mit verstärkter Sekretion von IL-17, welches in neuesten Studien verantwortlich für die Entstehung eines Morbus Crohn gesehen wird (Neurath, 2007).

Die Relevanz von IL-23 wird auch durch aktuelle genomweite Assoziationsstudien unterstrichen, welche eine Assoziation von Morbus Crohn mit *IL23R*-Polymorphismen nachgewiesen haben (Duerr, 2006; Glas, 2007). Das *IL23R*-Gen kodiert für

eine Untereinheit des Rezeptors für IL-23. Es wurden sowohl protektive wie auch Krankheits-assoziierte Varianten beschrieben. IL-23, dessen Rezeptoren und dessen Induktoren scheinen somit eine wichtige Verbindung zur Pathogenese des Morbus Crohn zu bilden. Zum Zeitpunkt dieser Dissertation stand kein sensitiver ELISA für IL-23 zur Verfügung, jedoch stellt die Korrelation des *NOD2*-Genotyps zur MDP-induzierten Ausschüttung von IL-23 und auch die Korrelation zum *IL23R*-Genotyp ein wichtiges Projekt für weitere Untersuchungen dar.

Regulation von Defensinen und NOD2

Neben der Dysregulation von Zytokinen wurden beim Morbus Crohn auch andere Faktoren als pathogenetisch relevant beschrieben. So scheint bei Morbus Crohn Patienten abhängig von der Lokalisation eine erniedrigte Konzentration von sogenannten Defensinen zu bestehen. Diese Defensine werden u.a. von spezialisierten Epithelzellen, den Paneth-Zellen, sezerniert und weisen antimikrobielle Wirkungen auf. Studien konnten in Morbus Crohn Patienten wie auch in Mausmodellen eine Verbindung zwischen *NOD2*-Mutationen und Defensindefizienz zeigen (Kobayashi, 2005; Wehkamp, 2004; Wehkamp, 2005). Im Dünndarm von Morbus Crohn-Patienten bestand ein Mangel an Humanem Defensin 5 und 6 (HD5 und HD6) und war bei Vorhandensein von *NOD2*-Mutationen stärker ausgeprägt (Wehkamp, 2005). *NOD2 knock-out* Mäuse zeigten eine verringerte mRNA Expression von Cryptidin, einem Paneth-Zell- α -Defensin, und waren empfänglicher für eine orale Infektion mit *Lysteria monocytogenes* (Kobayashi, 2005). Diese Beobachtungen sprechen für eine Rolle der *NOD2*-Mutationen in der Regulation der intestinalen Barriere gegen eine Invasion von Bakterien.

Die Regulation der Zytokinausschüttung ist deshalb nur ein Faktor von mehreren möglichen, welche die pathogenetische Relevanz der *NOD2*-Mutationen erklären können. Ein weiterer Faktor, welcher in dieser Doktorarbeit näher betrachtet wurde, besteht in der Regulation der Apoptose durch *NOD2* (s. Kapitel 4.2).

4.2 Diskussion der Apoptoseergebnisse

Die Regulation der Apoptose ist ein sehr wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie für mögliche pathogene invasive Mikroorganismen dar. Es ist vor allem in der Mukosa des gastrointestinalen Trakts wesentlich, dass zwischen pathogenen und nicht-pathogenen Organismen unterschieden werden kann (Duchmann, 1997). Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen bakterielle Bestandteile, die sogenannten PAMPs, mithilfe von extra- und intrazellulären Rezeptoren (PRR), den TLRs und NODs. Bindung dieser Liganden führt zur Initiierung inflammatorischer Prozesse.

Diese Prozesse müssen jedoch streng kontrolliert werden, damit es nicht durch eine unkontrollierte Entzündung zu Zerstörung von gesundem Gewebe kommt. Nachdem die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert worden sind, wird gleichzeitig die Apoptose eingeleitet, um eine unkontrollierte Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses zu vermeiden (Van Parijs, 1998). Neben Einleitung des Entzündungsprozesses wurde für manche TLRs eine proapoptotische Wirkung in bestimmten Zellen und unter bestimmten Bedingungen nachgewiesen (Aliprantis, 2001; Aliprantis, 2000; Fukui, 2003; Haase, 2003; Ruckdeschel, 2004).

Ist die Regulation der Apoptose in Richtung antiapoptotischer Mechanismen verschoben, kann eine chronische Entzündung entstehen (Van Parijs, 1998). Beim Morbus Crohn wird dies als pathogenetischer Faktor gesehen, da eine gestörte Apoptose von Monozyten und Lymphozyten wiederholt beschrieben worden ist (Boirivant, 1999; Ina, 1999; Itoh, 2001). Für mehrere in der Therapie des Morbus Crohn eingesetzten Medikamente wurde eine proapoptotische Wirkung auf Monozyten wie auch auf aktivierte T-Lymphozyten der Lamina propria beobachtet (Di Sabatino, 2004; Doering, 2004; Lugerling, 2001; Ringheanu, 2004; ten Hove, 2002). Deshalb scheint eine regulatorische Rolle des NOD2 im Apoptoseprozess eine mögliche pathogenetische Verbindung zum Morbus Crohn darzustellen. Diese Vermutung wird v.a. durch zwei frühere Studien gestützt. In der einen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von NOD2 mit konsekutiver Überexpression von Caspase-9 zu einer erhöhten Apoptoserate führt (Ogura, 2001b). Die zweite erst kürzlich veröffentlichte Studie beschrieb in dendritischen Zellen von NOD2-mutierten Individuen eine Hochregulation der Expression antiapoptotischer Gene nach Stimulation mit MDP (Zelinkova, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Stimulation von WT-NOD2-Monozyten mit MDP zu einer Induktion der Apoptose führt. Dieser Effekt war in Monozyten von 1007fs-NOD2 homozygoten Morbus Crohn Patienten vollständig aufgehoben. Daraus kann vermutet werden, dass der proapoptotische Effekt von NOD2 durch eine Interaktion mit MDP induziert werden kann und diese Interaktion bei der trunkierten Variante nicht mehr erfolgen kann. Die 1007fs-NOD2-Variante führt demnach nicht nur zu einer gestörten Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit MDP, sondern auch zu einer gestörten Apoptoseinduktion möglicherweise mit Aufrechterhaltung des Entzündungsprozesses. Dieser proapoptotische Effekt ist trotz der NF- κ B-induzierenden Wirkung von MDP in WT-NOD2-Monozyten zu sehen.

Die Stimulation mit MDP führt zu einer Apoptoseinduktion in humanen Monozyten

Die MDP-induzierte Apoptose ist abhängig vom Differenzierungsstadium der Monozyten

Da der proapoptotische Effekt von MDP nur beobachtet werden konnte, wenn Monozyten daran gehindert wurden zu adhären, scheint dieser Effekt von dem Differenzierungsstadium der Monozyten abhängig zu sein. Diese Beobachtung wird durch die unterschiedlichen Befunde zweier Studien gestützt (Lugering, 2001; Ringheanu, 2004). In beiden Studien wurde die Wirkung von Infliximab auf die Apoptose von Monozyten untersucht. In einer dieser Studien wurde ein proapoptotischer Effekt gesehen, welcher in der anderen fehlte. Es wurden unterschiedliche Isolationsmethoden angewendet, eine Tatsache, welche die Grundlage dieser Differenz bilden könnte. In der Studie ohne proapoptotischem Effekt von Infliximab wurden die Monozyten mithilfe von Adhärenz isoliert, welches die Differenzierung zu Makrophagen und eine Veränderung des Expressionsprofils von Proteinen induziert (Haskill, 1988). Differenzierung zu Makrophagen führt bekannterweise auch zu einer verminderten Expression von NOD2 (Lala, 2003 #171). In der zweiten Studie wurden, wie auch in der vorliegenden Arbeit, Monozyten mittels negativer Isolation magnetisch markierter Zellen gewonnen, welches eine Manipulation weitmöglichst minimiert. Obwohl beide Studien mit humanen Monozyten gearbeitet haben, ist es sehr wahrscheinlich, dass die verwendeten Monozyten somit ein unterschiedliches Differenzierungsstadium und damit auch ein unterschiedliches Expressionsprofil aufwiesen. Es ist wenig verwunderlich, dass somit diese Zellen unterschiedlich auf bakterielle Bestandteile reagieren können und gegensätzliche Reaktionen beobachtet werden können. Die Frage ist nun vor allem, ob eine erhöhte Apoptoresistenz bei 1007fs-homozygoten naiven Monozyten überhaupt pathogenetische Relevanz beim Morbus Crohn aufweist.

Morbus Crohn-Patienten weisen eine erhöhte Anzahl unreifer Monozyten im Gastrointestinaltrakt auf

Einige Studien stützen die Hypothese, dass unsere Beobachtung eine pathogenetische Bedeutung haben könnte. Darmbiopsien von Morbus Crohn-Patienten weisen eine distinkte Fraktion von Makrophagen auf, welche durch Merkmale eines unreifen Zustandes charakterisiert sind (Rugtveit, 1994). In einer akuten Exazerbation eines Morbus Crohn werden also Monozyten daran gehindert in einen höher-differenzierten Status zu wechseln. Diese unreifen Monozyten müssten dann nach Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen wie MDP apoptotisch werden. Bei Vorhandensein von Funktionsverlustmutationen im *NOD2*-Gen würden diese unreifen Makrophagen somit nicht apoptotisch werden und würden zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung eines Entzündungsprozesses im Darm führen. Diese Hypothese bedarf noch weiterer Untersuchungen.

Eine proapoptotische Wirkung von MDP konnte weder in peripheren Lymphozyten noch in LPMCs beobachtet werden. Da Lymphozyten NOD2 nicht exprimieren, ist dies nicht verwunderlich und unterstützt die Annahme einer Interaktion von MDP mit NOD2 bei der Apoptoseinduktion. Jedoch zeigten periphere Lymphozyten welche in Anwesenheit von Monozyten und MDP inkubiert wurden, eine leicht erhöhte Apoptoserate. Diese proapoptotische Tendenz scheint nicht durch lösliche Mediatoren vermittelt zu sein, da eine Inkubation mit Überstand von MDP-stimulierten Monozyten nicht zu einer Apoptoseerhöhung führt. Alternative Mechanismen wie z.B. Zell-Zellinteraktionen könnten eine mögliche Erklärung sein und bedürfen weiterer Untersuchungen.

Stimulation von Lymphozyten mit MDP führt nicht zu einer Apoptoseinduktion

Apoptose als regulatorische Komponente kann nicht nur zu gering ausgeprägt sein und zu einer verstärkten Zellproliferation führen, sondern auch zu stark ausgeprägt sein und Zellen, welche homöostatisch relevant sind, zu früh in den programmierten Zelltod führen. Beim Morbus Crohn scheint auch dies der Fall zu sein. Paneth-Zellen weisen, v.a. beim Vorhandensein von *XBP-1*-Morbus Crohn-assoziierten SNPs, eine erhöhte Apoptoserate auf und *XBP-1* knock-out Mäuse entwickeln spontan eine Enteritis (Kaser, 2008). Weiterhin besteht eine Verbindung zwischen den Morbus-Crohn-assoziierten SNPs im *ATG16L1*-Gen und Dysfunktion von humanen intestinalen Paneth-Zellen (Cadwell, 2008). Neben den immunkompetenten Zellen, welche in der Darmmukosa von Morbus Crohn-Patienten in zu hoher Zahl gefunden werden, scheint somit eine wichtige pathogenetische Rolle der Paneth-Zellen beim Morbus Crohn zu bestehen. Mehrere genetische Assoziation konnten mit einer Dysfunktion dieser spezialisierten Epithelzellen des Darmes in Zusammenhang gebracht werden.

Erhöhte Apoptoserate von Panethzellen beim Morbus Crohn

Obwohl es den Rahmen einer Doktorarbeit sprengen würde, beide dieser Komponenten zu untersuchen, müssen beide in weitere Überlegungen mit einbezogen werden. Denn mögliche Therapieansätze müßten die erhöhte Apoptoseresistenz einer Zellpopulation mit der erniedrigten Apoptoseresistenz der anderen Zellpopulation in Einklang bringen. Durchführbar ist dies vermutlich nur dann, wenn die zu Grunde liegenden Ursachen hinreichend geklärt sind.

4.3 Methodendiskussion

Während der Zellisolation können verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die Zellen ausüben. Eine Kontamination mit Mikroorganismen bzw. deren Bestandteilen kann zu einer Aktivierung der Zellen führen. Um dies möglichst zu vermeiden, wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar Air Flow gearbeitet und sterile

Isolation und Behandlung der Zellen

Reagenzien verwendet.

Aktivierung der Zellen wurde durch geeignete Behandlung minimiert

Auch unspezifische Stimuli wie erhöhte Temperatur oder mechanische Irritationen können zu einer Aktivitätsänderung der Zellen führen. Deshalb wurde zur Isolation der Monozyten eine möglichst schonende Methode verwendet. Die MACS-Isolation führt im Gegensatz zu der alternativ verwendbaren Adhärenzmethode zu einer geringeren Stimulation der Zellen und kann zudem auch zeitsparend durchgeführt werden.

Für die Zytokinuntersuchungen wurden die Monozyten negativ isoliert, d.h. die Monozyten wurden nicht mit Antikörpern markiert, da dadurch eine intrazelluläre Aktivierung möglichst gering gehalten werden kann. Für die Apoptoseuntersuchungen wurden die Monozyten positiv mit *CD14-MicroBeads* isoliert. Eine Veränderung des Untersuchungsergebnisses durch diese Isolation wurde durch Vergleich von zwei Proben, welche positiv bzw. negativ isoliert wurden, untersucht. Es konnte kein Unterschied in der Apoptoserate festgestellt werden, wodurch eine Beeinflussung der Apoptose durch diese positive *CD14-MicroBeads*-Isolation ausgeschlossen werden konnte.

Ein weiterer wichtiger Faktor, welcher das Aktivierungsstadium der Monozyten beeinflussen könnte, ist die erhöhte Temperatur. Um eine Aktivierung durch eine erhöhte Temperatur zu vermeiden, wurden ausschließlich gekühlte Reagenzien verwendet, Inkubationsschritte im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt und alle Proben innerhalb 4 Stunden nach Abnahme verarbeitet.

Die Reinheit der isolierten Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht und betrug zwischen 70-90%.

Zytokinmessungen

Die Zytokinkonzentrationen von TNF- α , IL-1 β , IL-12p40 und IL-10 wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits gemessen. Diese ELISA-Kits werden industriell standardisiert hergestellt und die Qualität wird durch Kontrolle von Stichproben aus einzelnen Chargen sichergestellt. Eine mögliche Fehlerquelle ist damit lediglich durch unsachgemäße Pipettiertechnik gegeben, was durch Doppelbestimmungen ausgeschlossen wurde.

Apoptoseuntersuchungen

Die Ermittlung der Apoptoserate durch Färbung mit FITC-markiertem Annexin V hat Vorteile wie auch Nachteile. Die Vorteile dieser Methode bestehen in ihrer hohen Sensitivität und Spezifität, die leichte und schnelle Handhabbarkeit und die große Menge an untersuchbaren Zellen.

Nachteilig ist, dass nicht für alle Zellen gezeigt worden ist, dass sie durch Apoptose die Assymetrie der PS-Verteilung ihrer Zellmembran verlieren (Allen, 1997). Für

Monozyten wurde dies jedoch bereits gezeigt, weshalb eine weitere Methode zur Bestätigung der Ergebnisse nicht erforderlich war (Kiener, 1997). Weiterhin kommt es bei der späten Apoptose zu einem Verlust der Zellmembranintegrität, erkennbar durch die Aufnahme von PI ins Zellinnere. Deshalb kann es schwierig sein, zwischen primärer Nekrose oder einer späten Apoptose mit Verlust der Zellintegrität zu unterscheiden. Dies kann dadurch überwunden werden, dass die Zellen zu einem früheren Zeitpunkt untersucht werden und somit in einer früheren Phase der Apoptose gefärbt werden. Eine weitere Schwierigkeit besteht in der Verwendung von adhären Zellen. Zum einen verlieren apoptotische Zellen ihre Fähigkeit zu adhären und finden sich deshalb im Überstand, zum anderen kann eine Verwendung von Trypsin zur Gewinnung der adhären Zelle eine artifizielle Exposition des PS induzieren (van Engeland, 1996). Die Verwendung von mechanischen Kräften als Alternative kann zur Zerstörung der Zellmembran führen und somit eine erhöhte Fraktion Annexin V+/PI+ Zellen vortäuschen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen nur dann als apoptotisch bezeichnet, wenn diese Zellen PI-negativ waren. Damit wurden Zellen ausgeschlossen, welche sich in der späten Phase der Apoptose befanden. Eine irrtümliche Zurechnung von nekrotischen Zellen wurde damit vermieden.

Kultivierung von Monozyten auf normalen Polystyrol-Platten führt zu einer starken Adhärenz und zur Differenzierung der Zellen zu Makrophagen. Um die Problematik der Ablösung zu umgehen, wurden zur Kultivierung *Ultra-Low-Attachment*-Platten verwendet, die beschichtet sind und somit eine Adhärenz vermeiden (s. Kapitel 2.3.2). Eine Behandlung mit Trypsin oder Verwendung mechanischer Kraft war somit nicht notwendig.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere neue Erkenntnisse hinsichtlich der Rolle des NOD2-Proteins bei der Pathogenese des Morbus Crohn gewonnen werden. Jedoch werfen diese Erkenntnisse weitere Fragen auf, welche in der Zukunft noch beantwortet werden müssen.

Konsequenzen aus den Zytokinuntersuchungen

Es konnte gezeigt werden, dass es bei Vorhandensein von zwei mutierten *NOD2*-Allelen zu einer veränderten MDP-induzierten Zytokinantwort kommt. Das Ausmaß der Veränderung, also das vollständige Ausbleiben oder nur ein Abschwächen der Antwort, scheint abhängig von der *NOD2*-Genotypkonstellation zu sein. Das Vorhandensein eines 1007fs-Allels bei Doppelmutationsträgern ist der entscheidende Faktor, welcher zu einem völligen Verlust der Antwort führt. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Interaktionen von NOD2 mit verschiedenen TLRs existieren. Da in Studien, welche ein humanes Zellsystem verwendet haben, einzig die 1007fs-*NOD2*-homozygoten Träger untersucht wurden, stellt sich nun auch die Frage, inwieweit diese *NOD2*-TLR-Interaktionen durch die anderen beiden Mutationen, R702W und G908R, beeinflusst werden. Unterschiede in der Ausprägung scheinen auch hier wahrscheinlich zu sein und könnten diagnostische oder therapeutische Konsequenzen haben. Eine Studie von Yang et al konnte kürzlich zeigen, dass die Präinkubation mit MDP in *NOD2*-WT-Zellen eine verminderte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit unterschiedlichen TLR-Liganden induzieren kann (Yang, 2007). Dies könnte möglicherweise therapeutisch bei Morbus Crohn-Patienten angewendet werden, falls diese zumindest ein WT-*NOD2*-Allel aufweisen. Wichtig ist jedoch zu wissen, inwieweit Morbus Crohn-Patienten, welche zwei mutierte *NOD2*-Allele aufweisen, von einem solchen möglichen therapeutischen Effekt profitieren könnten. Um dies festzustellen, werden weitere Studien mit Patienten dieser Genotypen benötigt.

Die interessante Beobachtung, dass Morbus Crohn-Patienten mit zwei mutierten *NOD2*-Allelen erhöhte basale IL-12p40-Spiegel aufwiesen, wirft ebenso weitere Fragen auf. Es ist bekannt, dass Morbus Crohn-Patienten einen erhöhten Spiegel an IL-12/23p40 in der Darmmukosa aufweisen. Nun gilt zu klären, inwieweit der *NOD2*-Status als Risikofaktor für eine erhöhte Konzentration an IL-12/23p40 in der Darmmukosa steht. Dies könnte auch therapeutische Konsequenzen haben, da Studien mit Anti-IL-12/23p40 Antikörpern erste Erfolge erzielt haben. Bestünde eine Korrelation des *NOD2*-Genotyps mit einer erhöhten IL-12/23p40 Konzentration im Darm, könnte dies als ein Selektionskriterium für diese Therapie verwendet werden.

In dieser Studie konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass NOD2 bei der Regulation der durch bakterielle Bestandteile bzw. MDP hervorgerufenen Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Eine proapoptotische Wirkung von MDP konnte in Monozyten von *NOD2*-WT-Individuen festgestellt werden. Dieser Effekt war in Monozyten von 1007fs-homozygoten Trägern nicht zu beobachten und zeigt somit die NOD2-Abhängigkeit der MDP-induzierten Apoptose. Die proapoptotische Wirkung einer NOD2-Stimulation könnte in Zukunft therapeutische Möglichkeiten aufwerfen. Schon Yang et al postulierten eine therapeutische Anwendbarkeit von Expressionsinduktion von NOD2 in WT-Morbus Crohn-Patienten (Yang, 2007). Obwohl dies noch weit entfernt von tatsächlicher Anwendbarkeit ist, stellt dies eine begründete Hypothese dar. Morbus Crohn-Patienten, welche zwei mutierte *NOD2*-Allele aufweisen, würden auch hier nicht von dieser Therapie profitieren und würden somit durch ihren *NOD2*-Genotyp präselektiert werden. Deshalb ist es auch für die proapoptotische Wirkung von MDP wichtig, die beiden anderen *NOD2*-Varianten daraufhin zu untersuchen. Weiterhin ist es wichtig, den Mechanismus der Apoptoseinduktion durch MDP zu entschlüsseln.

Die proapoptotische Wirkung von MDP ist nicht nur abhängig von einem intakten NOD2-Protein, sondern auch von dem Differenzierungszustand der Monozyten. Die Relevanz dieser Tatsache muss weiter untersucht werden. Auch andere Zellen des angeborenen Immunsystems sollten untersucht werden, um ein genaues Profil der Zellen, welche durch eine NOD2-Stimulation apoptotisch werden, zu erhalten. Obwohl Zellen des erworbenen Immunsystems, also Lymphozyten, NOD2 nicht exprimieren, sollte auch in diesen Zellen verschiedener Differenzierungsstadien eine eventuelle MDP-induzierte Apoptose untersucht werden, da auch diese Zellen eine erhöhte Apoptoseresistenz bei Morbus Crohn-Patienten aufweisen. Eine tendenzielle Steigerung der Apoptoserate nach Stimulation mit MDP konnte in Lymphozyten gezeigt werden, sofern sie mit Monozyten inkubiert werden. Der genaue Mechanismus dieser Beobachtung könnte ebenso Bestandteil weiterer Untersuchungen sein.

Konsequenzen aus den Apoptoseuntersuchungen

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der funktionellen Bedeutung der NOD2-Mutationen bei der Pathogenese des Morbus Crohn. Das NOD2-Gen wurde 2001 als erstes Suszeptibilitätsgen für die chronisch entzündliche Darmerkrankung (CED) Morbus Crohn identifiziert. Bis heute konnte die pathogenetische Rolle der NOD2-Mutationen nicht vollständig geklärt werden.

Die Schwerpunkte der Arbeit waren zum einen die Untersuchung der Auswirkungen von NOD2-Mutationen auf die Zytokinproduktion, zum anderen die physiologische Rolle von NOD2 in der Apoptoseregulation und die Auswirkungen der NOD2-Mutationen. Es wurden aufgereinigte humane Monozyten und Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder Kontrollen bzw. Morbus Crohn-Patienten mit verschiedenen NOD2-Genotypen und mononukleäre Zellen aus der Lamina propria gesunder Kontrollen untersucht. Muramyl-Dipeptid (MDP), ein bakterieller Bestandteil von Peptidoglykan, wurde als spezifischer NOD2-Ligand verwendet. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen können folgende Aussagen getroffen werden:

1. *Monozyten von Individuen mit zwei mutierten NOD2-Allelen zeigen eine verminderte Freisetzung von TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-12p40 nach Stimulation mit MDP*
 - a. Auch die beiden weniger untersuchten NOD2-Mutationen R702W und G908R führen zu einer verminderten Freisetzung von TNF- α , IL-10, IL-1 β und IL-12p40 nach Stimulation mit MDP
 - b. Das Vorhandensein mindestens eines 1007fs-NOD2-Allels bei Individuen mit zwei mutierten Allelen reicht zur vollständigen Aufhebung der Rezeptorfunktion aus. Ist keines der beiden Allele ein 1007fs-NOD2-Allel, aber beide Allele Morbus Crohn-assoziierte NOD2-Vari-

anten, so kommt es zu einer verringerten, jedoch noch messbaren Zytokinfreisetzung nach Stimulation mit MDP.

2. *Isolierte Monozyten von Morbus Crohn-Patienten mit zwei mutierten NOD2-Allelen zeigen eine erhöhte basale Freisetzung von IL-12p40 in der Zellkultur*
3. *Stimulation von Monozyten mit MDP führt zu einer Erhöhung der Apoptoserate nach 24h*
 - a. Die Apoptoseinduktion ist abhängig vom *NOD2*-Genotyp: 1007fs-*NOD2*-homozygote Monozyten reagieren nicht mit einer erhöhten Apoptoserate auf eine Stimulation mit MDP im Gegensatz zu WT-*NOD2*-Monozyten
 - b. Die Apoptoseinduktion ist abhängig vom Differenzierungsstadium: Besteht für die Monozyten die Möglichkeit zu adhären und damit zu differenzieren, reagieren sie nicht mit einer erhöhten Apoptoserate nach Stimulation mit MDP
 - c. Die Apoptoseinduktion durch MDP ist auf Monozyten beschränkt. Lymphozyten, welche *NOD2* nicht exprimieren, reagieren nicht mit einer erhöhten Apoptoserate nach Stimulation mit MDP

Die vorliegende Studie bestätigt damit Ergebnisse früherer Studien in humanen Zellen, welche ebenso einen Verlust der MDP-induzierten Zytokinfreisetzung beim Vorhandensein von *NOD2*-Mutationen zeigen konnten (Li, 2004; Netea, 2005a; van Heel, 2006). Erweitert werden diese Befunde insofern, dass in der vorliegenden Arbeit auch die Relevanz der beiden anderen Morbus Crohn-assoziierten Mutationen R702W und G908R untersucht worden ist. In diesem Zusammenhang konnte ein starker Einfluss der 1007fs-Mutation auf die Rezeptorfunktion des *NOD2*-Proteins gezeigt werden, da bei Individuen mit zwei mutierten *NOD2*-Allelen eine 1007fs-Variante für den vollständigen Verlust der MDP-induzierten Zytokinfreisetzung ausreicht. Vor allem die Ergebnisse für IL-1 β stehen im Kontrast zu Ergebnissen in murinen Modellen, welche eine erhöhte Freisetzung von IL-1 β bei Vorhandensein einer 1007fs-äquivalenten *NOD2*-Variante zeigen konnten (Maeda, 2005). Dies ist ein weiteres Indiz für die schwierige Übertragbarkeit von Befunden muriner Modelle auf humane Systeme.

Hervorzuheben sind die Befunde der MDP-unabhängigen erhöhten basalen IL-12p40-Freisetzung durch Monozyten von Morbus Crohn-Patienten mit zwei mutierten *NOD2*-Allelen. Studien in murinen Zellen konnten eine negative Regulation der IL-12p40-Freisetzung durch *NOD2* nach TLR2-Stimulation zeigen (Watanabe, 2004; Yang, 2007), was in humanen Zellen bis heute nicht reproduziert werden konnte.

Erstmals konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass NOD2, welches strukturelle Ähnlichkeit mit Apoptoseregulatoren aufweist, eine Rolle in der Apoptoseregulation von Zellen des angeborenen Immunsystems spielt. Diese MDP-induzierte Apoptose von Monozyten ist abhängig vom Vorhandensein eines intakten NOD2-Proteins und auch von Bedingungen, welche die Differenzierung von Monozyten beeinflussen und sie in einem unreiferen Zustand halten können. Auch Morbus Crohn-Patienten weisen in der Darmmukosa eine erhöhte Fraktion unreifer Makrophagen auf (Rugtveit, 1994), eine Tatsache, welche die pathogenetische Relevanz dieser Beobachtungen stützt.

In der vorliegenden Studie wurden zwei unterschiedliche Auswirkungen der Morbus Crohn-assoziierten NOD2-Mutationen untersucht. Weitere Daten werden benötigt, um die physiologische Rolle des NOD2-Proteins und die pathogenetische Funktion von NOD2-Mutationen endgültig klären zu können. Diese Erkenntnisse könnten möglicherweise in der Zukunft zu einer Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten beim Morbus Crohn beitragen.

Literaturverzeichnis

Adams, J.M., Cory, S., 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Aliprantis, A.O., Weiss, D.S., Zychlinsky, A., 2001. Toll-like receptor-2 transduces signals for NF-kappa B activation, apoptosis and reactive oxygen species production. *J Endotoxin Res* 7, 287-291.

Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Weiss, D.S., Godowski, P., Zychlinsky, A., 2000. The apoptotic signaling pathway activated by Toll-like receptor-2. *Embo J* 19, 3325-3336.

Allen, R.T., Hunter, W.J., 3rd, Agrawal, D.K., 1997. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 37, 215-228.

Andres, P.G., Friedman, L.S., 1999. Epidemiology and the natural course of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 28, 255-281, vii.

Arbour, N.C., Lorenz, E., Schutte, B.C., Zabner, J., Kline, J.N., Jones, M., Frees, K., Watt, J.L., Schwartz, D.A., 2000. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 25, 187-191.

Ashkenazi, A., 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.

Autschbach, F., Eisold, S., Hinz, U., Zinser, S., Linnebacher, M., Giese, T., Loffler, T., Buchler, M.W., Schmidt, J., 2005. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut* 54, 944-949.

Bakkevold, K.E., 2000. Nipple valve anastomosis for preventing recurrence of Crohn disease in the neoterminal ileum after ileocolic resection. A prospective pilot study. *Scand J Gastroenterol* 35, 293-299.

Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., Bitton, A., Dassopoulos, T., Datta, L.W., Green, T., Griffiths, A.M., Kistner, E.O., Murtha, M.T., Regueiro, M.D., Rotter, J.I., Schumm, L.P., Steinhardt, A.H., Targan, S.R., Xavier, R.J., Libioulle, C., Sandor, C., Lathrop, M., Belaiche, J., Dewit, O., Gut, I., Heath, S., Laukens, D., Mni, M., Rutgeerts, P., Van Gossum, A., Zelenika, D., Franchimont, D., Hugot, J.P., de Vos, M., Vermeire, S., Louis, E., Cardon, L.R., Anderson, C.A., Drummond, H., Nimmo, E., Ahmad, T., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Fisher, S.A., Marchini, J., Ghorri, J., Bumpstead, S., Gwilliam, R., Tremelling, M., Deloukas, P., Mansfield, J., Jewell, D., Satsangi, J., Mathew, C.G., Parkes, M., Georges, M., Daly, M.J., 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 40, 955-962.

- Batra, A., Pietsch, J., Fedke, I., Glauen, R., Okur, B., Stroh, T., Zeitz, M., Siegmund, B., 2007. Leptin-dependent toll-like receptor expression and responsiveness in preadipocytes and adipocytes. *Am J Pathol* 170, 1931-1941.
- Bayless, T.M., Tokayer, A.Z., Polito, J.M., 2nd, Quaskey, S.A., Mellits, E.D., Harris, M.L., 1996. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members--potential hereditary influences. *Gastroenterology* 111, 573-579.
- BB Crohn, L.G., GD Oppenheimer 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. *JAMA* 99, 1323-1329.
- Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P.R., Autenrieth, I., Neurath, M.F., 2003. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 112, 693-706.
- Best, W.R., Beckett, J.M., Singleton, J.W., Kern, F., Jr., 1976. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 70, 439-444.
- Beynon, V., Cotofana, S., Brand, S., Lohse, P., Mair, A., Wagner, S., Mussack, T., Ochsenkuhn, T., Folwaczny, M., Folwaczny, C., Glas, J., Torok, H.P., 2008. NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm Bowel Dis* 14, 1033-1040.
- Blumberg, R.S., Saubermann, L.J., Strober, W., 1999. Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol* 11, 648-656.
- Boatright, K.M., Renatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherland, D.P., Green, D.R., Salvesen, G.S., 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.
- Bairivant, M., Marini, M., Di Felice, G., Pronio, A.M., Montesani, C., Tersigni, R., Strober, W., 1999. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 116, 557-565.
- Bairivant, M., Pica, R., DeMaria, R., Testi, R., Pallone, F., Strober, W., 1996. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 98, 2616-2622.
- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D., 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Bonen, D.K., Cho, J.H., 2003a. The genetics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 124, 521-536.
- Bonen, D.K., Ogura, Y., Nicolae, D.L., Inohara, N., Saab, L., Tanabe, T., Chen, F.F., Foster, S.J., Duerr, R.H., Brant, S.R., Cho, J.H., Nunez, G., 2003b. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Gastroenterology* 124, 140-146.
- Braat, H., McGuirk, P., Ten Kate, F.J., Huibregtse, I., Dunne, P.J., Hommes, D.W., Van Deventer, S.J., Mills, K.H., 2007. Prevention of experimental colitis by

parenteral administration of a pathogen-derived immunomodulatory molecule. *Gut* 56, 351-357.

Braat, H., Peppelenbosch, M.P., Hommes, D.W., 2006. Immunology of Crohn's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1072, 135-154.

Brand, S., 2009. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: New immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* ; in press

Brand, S., Beigel, F., Olszak, T., Zitzmann, K., Eichhorst, S.T., Otte, J.M., Diepolder, H., Marquardt, A., Jagla, W., Popp, A., Leclair, S., Herrmann, K., Seiderer, J., Ochsenkuhn, T., Goke, B., Auernhammer, C.J., Dambacher, J., 2006. IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290, G827-838.

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

Braunstein, J., Qiao, L., Autschbach, F., Schurmann, G., Meuer, S., 1997. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 41, 215-220.

Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., Shore, G.C., 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608-8618.

Bull, T.J., McMinn, E.J., Sidi-Boumedine, K., Skull, A., Durkin, D., Neild, P., Rhodes, G., Pickup, R., Hermon-Taylor, J., 2003. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 41, 2915-2923.

Burnham, W.R., Lennard-Jones, J.E., Stanford, J.L., Bird, R.G., 1978. Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *Lancet* 2, 693-696.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., Stone, C.D., Brunt, E.M., Xavier, R.J., Sleckman, B.P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T.S., Virgin, H.W.t., 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene *Atg16l1* in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 456, 259-263.

Card, T., Logan, R.F., Rodrigues, L.C., Wheeler, J.G., 2004. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 53, 246-250.

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

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

Clarkston, W.K., Presti, M.E., Petersen, P.F., Zachary, P.E., Jr., Fan, W.X., Leonardi, C.L., Vernava, A.M., 3rd, Longo, W.E., Kreeger, J.M., 1998. Role of

- Mycobacterium paratuberculosis in Crohn's disease: a prospective, controlled study using polymerase chain reaction. *Dis Colon Rectum* 41, 195-199.
- Colombel, J.F., Grandbastien, B., Gower-Rousseau, C., Plegat, S., Evrard, J.P., Dupas, J.L., Gendre, J.P., Modigliani, R., Belaiche, J., Hostein, J., Hugot, J.P., van Kruiningen, H., Cortot, A., 1996. Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. *Gastroenterology* 111, 604-607.
- Cosnes, J., Beaugerie, L., Carbonnel, F., Gendre, J.P., 2001. Smoking cessation and the course of Crohn's disease: an intervention study. *Gastroenterology* 120, 1093-1099.
- Croese, J., O'Neil, J., Masson, J., Cooke, S., Melrose, W., Pritchard, D., Speare, R., 2006. A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut* 55, 136-137.
- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S.A., Gorman, D., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- D'Haens, G.R., Geboes, K., Peeters, M., Baert, F., Penninckx, F., Rutgeerts, P., 1998. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 114, 262-267.
- Dalziel, T., 1913. Chronic interstitial enteritis. *Br J Med* 2, 1068-1070.
- Dambacher, J., Beigel, F., Zitzmann, K., de Toni, E., Goke, B., Diepolder, H.M., Auernhammer, C.J., Brand, S., 2008. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut*.
- Danial, N.N., Korsmeyer, S.J., 2004. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- De Hertogh, G., Aerssens, J., Geboes, K.P., Geboes, K., 2008. Evidence for the involvement of infectious agents in the pathogenesis of Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 14, 845-852.
- De Jager, P.L., Franchimont, D., Waliszewska, A., Bitton, A., Cohen, A., Langelier, D., Belaiche, J., Vermeire, S., Farwell, L., Goris, A., Libiouille, C., Jani, N., Dassopoulos, T., Bromfield, G.P., Dubois, B., Cho, J.H., Brant, S.R., Duerr, R.H., Yang, H., Rotter, J.I., Silverberg, M.S., Steinhart, A.H., Daly, M.J., Podolsky, D.K., Louis, E., Hafler, D.A., Rioux, J.D., 2007. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun* 8, 387-397.
- Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J., 2003. A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Demling, L., 1994. Is Crohn's disease caused by antibiotics? *Hepatogastroenterology* 41, 549-551.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C., 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-252.
- Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cinque, B., Millimaggi, D., Morera, R., Ricevuti, L., Cifone, M.G., Corazza, G.R., 2004. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 53, 70-77.

- Dinarelli, C.A., 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.
- Doering, J., Begue, B., Lentze, M.J., Rieux-Laucat, F., Goulet, O., Schmitz, J., Cerf-Bensussan, N., Ruemmele, F.M., 2004. Induction of T lymphocyte apoptosis by sulphasalazine in patients with Crohn's disease. *Gut* 53, 1632-1638.
- Dolis, D., Moreau, C., Zachowski, A., Devaux, P.F., 1997. Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic. *Biophys Chem* 68, 221-231.
- Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C., Grutter, M.G., 2003. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 11, 543-549.
- Duchmann, R., Neurath, M., Marker-Hermann, E., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., 1997. Immune responses towards intestinal bacteria--current concepts and future perspectives. *Z Gastroenterol* 35, 337-346.
- Duerr, R.H., Taylor, K.D., Brant, S.R., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Daly, M.J., Steinhart, A.H., Abraham, C., Regueiro, M., Griffiths, A., Dassopoulos, T., Bitton, A., Yang, H., Targan, S., Datta, L.W., Kistner, E.O., Schumm, L.P., Lee, A.T., Gregersen, P.K., Barnada, M.M., Rotter, J.I., Nicolae, D.L., Cho, J.H., 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314, 1461-1463.
- Duffy, L.C., Zielesny, M.A., Marshall, J.R., Byers, T.E., Weiser, M.M., Phillips, J.F., Calkins, B.M., Ogra, P.L., Graham, S., 1991. Relevance of major stress events as an indicator of disease activity prevalence in inflammatory bowel disease. *Behav Med* 17, 101-110.
- Ekbom, A., Helmick, C., Zack, M., Adami, H.O., 1990. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 336, 357-359.
- Ekbom, A., Helmick, C.G., Zack, M., Holmberg, L., Adami, H.O., 1992. Survival and causes of death in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Gastroenterology* 103, 954-960.
- Elphick, D.A., Mahida, Y.R., 2005. Paneth cells: their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut* 54, 1802-1809.
- Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., Riddell, R.H., 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 109, 1344-1367.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
- Farmer, R.G., Michener, W.M., Mortimer, E.A., 1980. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol* 9, 271-277.
- Fedorak, R.N., Gangl, A., Elson, C.O., Rutgeerts, P., Schreiber, S., Wild, G., Hanauer, S.B., Kilian, A., Cohard, M., LeBeaut, A., Feagan, B., 2000. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 119, 1473-1482.

- Folwaczny, C., Noehl, N., Endres, S.P., Loeschke, K., Fricke, H., 1998. Antineutrophil and pancreatic autoantibodies in first-degree relatives of patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 33, 523-528.
- Folwaczny, C., Noehl, N., Tschop, K., Endres, S.P., Heldwein, W., Loeschke, K., Fricke, H., 1997. Goblet cell autoantibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives. *Gastroenterology* 113, 101-106.
- Franchimont, D., Vermeire, S., El Housni, H., Pierik, M., Van Steen, K., Gustot, T., Quertinmont, E., Abramowicz, M., Van Gossum, A., Deviere, J., Rutgeerts, P., 2004. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 987-992.
- Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13780-13785.
- Fuentes-Prior, P., Salvesen, G.S., 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y., 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52, 65-70.
- Fukui, M., Imamura, R., Umemura, M., Kawabe, T., Suda, T., 2003. Pathogen-associated molecular patterns sensitize macrophages to Fas ligand-induced apoptosis and IL-1 beta release. *J Immunol* 171, 1868-1874.
- Gasche, C., Scholmerich, J., Brynskov, J., D'Haens, G., Hanauer, S.B., Irvine, E.J., Jewell, D.P., Rachmilewitz, D., Sachar, D.B., Sandborn, W.J., Sutherland, L.R., 2000. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 6, 8-15.
- Gent, A.E., Hellier, M.D., Grace, R.H., Swarbrick, E.T., Coggon, D., 1994. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 343, 766-767.
- Girardin, S.E., Boneca, I.G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D.J., Sansonetti, P.J., 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278, 8869-8872.
- Glas, J., Seiderer, J., Wetzke, M., Konrad, A., Torok, H.P., Schmechel, S., Tonenchi, L., Grassl, C., Dambacher, J., Pfennig, S., Maier, K., Griga, T., Klein, W., Epplen, J.T., Schiemann, U., Folwaczny, C., Lohse, P., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Muller-Myhsok, B., Folwaczny, M., Mussack, T., Brand, S., 2007. rs1004819 is the main disease-associated IL23R variant in German Crohn's disease patients: combined analysis of IL23R, CARD15, and OCTN1/2 variants. *PLoS ONE* 2, e819.
- Glas, J., Torok, H.P., Vilsmaier, F., Herbinger, K.H., Hoelscher, M., Folwaczny, C., 2002. Anti-saccharomyces cerevisiae antibodies in patients with inflammatory bowel disease and their first-degree relatives: potential clinical value. *Digestion* 66, 173-177.
- Gutierrez, O., Pipaon, C., Inohara, N., Fontalba, A., Ogura, Y., Prosper, F., Nunez, G., Fernandez-Luna, J.L., 2002. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem* 277, 41701-41705.

- Haase, R., Kirschning, C.J., Sing, A., Schrottner, P., Fukase, K., Kusumoto, S., Wagner, H., Heesemann, J., Ruckdeschel, K., 2003. A dominant role of Toll-like receptor 4 in the signaling of apoptosis in bacteria-faced macrophages. *J Immunol* 171, 4294-4303.
- Hampe, J., Cuthbert, A., Croucher, P.J., Mirza, M.M., Mascheretti, S., Fisher, S., Frenzel, H., King, K., Hasselmeyer, A., MacPherson, A.J., Bridger, S., van Deventer, S., Forbes, A., Nikolaus, S., Lennard-Jones, J.E., Foelsch, U.R., Krawczak, M., Lewis, C., Schreiber, S., Mathew, C.G., 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 357, 1925-1928.
- Hanauer, S.B., 2006. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12 Suppl 1, S3-9.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., Weaver, C.T., 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6, 1123-1132.
- Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J., 2005. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 129, 50-65.
- Hasegawa, M., Yang, K., Hashimoto, M., Park, J.H., Kim, Y.G., Fujimoto, Y., Nunez, G., Fukase, K., Inohara, N., 2006. Differential release and distribution of Nod1 and Nod2 immunostimulatory molecules among bacterial species and environments. *J Biol Chem* 281, 29054-29063.
- Haskill, S., Johnson, C., Eierman, D., Becker, S., Warren, K., 1988. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J Immunol* 140, 1690-1694.
- Hausmann, M., Kiessling, S., Mestermann, S., Webb, G., Spottl, T., Andus, T., Scholmerich, J., Herfarth, H., Ray, K., Falk, W., Rogler, G., 2002. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122, 1987-2000.
- Hedl, M., Li, J., Cho, J.H., Abraham, C., 2007. Chronic stimulation of Nod2 mediates tolerance to bacterial products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19440-19445.
- Hilsden, R.J., Meddings, J.B., Sutherland, L.R., 1996. Intestinal permeability changes in response to acetylsalicylic acid in relatives of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 110, 1395-1403.
- Hirschhorn, J.N., Daly, M.J., 2005. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* 6, 95-108.
- Hofmann, K., Bucher, P., Tschopp, J., 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22, 155-156.
- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., Rotter, J.I., 1986. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 105, 883-885.
- Hugot, J.P., Alberti, C., Berrebi, D., Bingen, E., Cezard, J.P., 2003. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 362, 2012-2015.

- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M., Thomas, G., 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 599-603.
- Ina, K., Itoh, J., Fukushima, K., Kusugami, K., Yamaguchi, T., Kyokane, K., Imada, A., Binion, D.G., Musso, A., West, G.A., Dobre, G.M., McCormick, T.S., Lapetina, E.G., Levine, A.D., Ottaway, C.A., Fiocchi, C., 1999. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 163, 1081-1090.
- Inohara, Chamaillard, McDonald, C., Nunez, G., 2005. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74, 355-383.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S.J., Moran, A.P., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 278, 5509-5512.
- Itoh, J., de La Motte, C., Strong, S.A., Levine, A.D., Fiocchi, C., 2001. Decreased Bax expression by mucosal T cells favours resistance to apoptosis in Crohn's disease. *Gut* 49, 35-41.
- Jantschek, G., Zeitz, M., Pritsch, M., Wirsching, M., Klor, H.U., Stedt, H.H., Rasenack, J., Deter, H.C., Riecken, E.O., Feiereis, H., Keller, W., 1998. Effect of psychotherapy on the course of Crohn's disease. Results of the German prospective multicenter psychotherapy treatment study on Crohn's disease. German Study Group on Psychosocial Intervention in Crohn's Disease. *Scand J Gastroenterol* 33, 1289-1296.
- Jess, T., Riis, L., Vind, I., Winther, K.V., Borg, S., Binder, V., Langholz, E., Thomsen, O.O., Munkholm, P., 2007. Changes in clinical characteristics, course, and prognosis of inflammatory bowel disease during the last 5 decades: a population-based study from Copenhagen, Denmark. *Inflamm Bowel Dis* 13, 481-489.
- Jess, T., Winther, K.V., Munkholm, P., Langholz, E., Binder, V., 2002. Mortality and causes of death in Crohn's disease: follow-up of a population-based cohort in Copenhagen County, Denmark. *Gastroenterology* 122, 1808-1814.
- Jurjus, A.R., Khoury, N.N., Reimund, J.M., 2004. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 50, 81-92.
- Kaser, A., Lee, A.H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2008. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell* 134, 743-756.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kiener, P.A., Davis, P.M., Starling, G.C., Mehlin, C., Klebanoff, S.J., Ledbetter, J.A., Liles, W.C., 1997. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 185, 1511-1516.

- Kirsner, J.B., 1988. Historical aspects of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol* 10, 286-297.
- Kobayashi, K.S., Chamaillard, M., Ogura, Y., Henegariu, O., Inohara, N., Nunez, G., Flavell, R.A., 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 307, 731-734.
- Koletzko, S., Sherman, P., Corey, M., Griffiths, A., Smith, C., 1989. Role of infant feeding practices in development of Crohn's disease in childhood. *Bmj* 298, 1617-1618.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Koths, K., Kwiatkowski, D.J., Williams, L.T., 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., Krause, D.O., 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 669-675.
- Kramer, M., Netea, M.G., de Jong, D.J., Kullberg, B.J., Adema, G.J., 2006. Impaired dendritic cell function in Crohn's disease patients with NOD2 3020insC mutation. *J Leukoc Biol* 79, 860-866.
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W., 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274.
- Lala, S., Ogura, Y., Osborne, C., Hor, S.Y., Bromfield, A., Davies, S., Ogunbiyi, O., Nunez, G., Keshav, S., 2003. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125, 47-57.
- Lawen, A., 2003. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 25, 888-896.
- Li, J., Moran, T., Swanson, E., Julian, C., Harris, J., Bonen, D.K., Hedl, M., Nicolae, D.L., Abraham, C., Cho, J.H., 2004. Regulation of IL-8 and IL-1beta expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Hum Mol Genet* 13, 1715-1725.
- Libioulle, C., Louis, E., Hansoul, S., Sandor, C., Farnir, F., Franchimont, D., Vermeire, S., Dewit, O., de Vos, M., Dixon, A., Demarche, B., Gut, I., Heath, S., Foglio, M., Liang, L., Laukens, D., Mni, M., Zelenika, D., Van Gossum, A., Rutgeerts, P., Belaiche, J., Lathrop, M., Georges, M., 2007. Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet* 3, e58.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157.
- Liu, Y., van Kruiningen, H.J., West, A.B., Cartun, R.W., Cortot, A., Colombel, J.F., 1995. Immunocytochemical evidence of *Listeria*, *Escherichia coli*, and *Streptococcus* antigens in Crohn's disease. *Gastroenterology* 108, 1396-1404.
- Loftus, E.V., Jr., Sandborn, W.J., 2002. Epidemiology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 31, 1-20.
- Lugering, A., Schmidt, M., Lugering, N., Pauels, H.G., Domschke, W., Kucharzik, T., 2001. Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic

active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway. *Gastroenterology* 121, 1145-1157.

Maaser, C., Heidemann, J., von Eiff, C., Luger, A., Spahn, T.W., Binion, D.G., Domschke, W., Luger, N., Kucharzik, T., 2004. Human intestinal microvascular endothelial cells express Toll-like receptor 5: a binding partner for bacterial flagellin. *J Immunol* 172, 5056-5062.

Madsen, K.L., Malfair, D., Gray, D., Doyle, J.S., Jewell, L.D., Fedorak, R.N., 1999. Interleukin-10 gene-deficient mice develop a primary intestinal permeability defect in response to enteric microflora. *Inflamm Bowel Dis* 5, 262-270.

Maeda, S., Hsu, L.C., Liu, H., Bankston, L.A., Iimura, M., Kagnoff, M.F., Eckmann, L., Karin, M., 2005. Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF-kappaB activity and IL-1beta processing. *Science* 307, 734-738.

Mahida, Y.R., Wu, K., Jewell, D.P., 1989. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 30, 835-838.

Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M.G., Piccinni, M.P., Maggi, E., Trinchieri, G., Romagnani, S., 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177, 1199-1204.

Mannon, P.J., Fuss, I.J., Mayer, L., Elson, C.O., Sandborn, W.J., Present, D., Dolin, B., Goodman, N., Groden, C., Hornung, R.L., Quezada, M., Yang, Z., Neurath, M.F., Salfeld, J., Veldman, G.M., Schwertschlag, U., Strober, W., 2004. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 351, 2069-2079.

Marteau, P., Lepage, P., Mangin, I., Suau, A., Dore, J., Pochart, P., Seksik, P., 2004. Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 20 Suppl 4, 18-23.

Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C., Green, D.R., 1995. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem* 270, 6425-6428.

Mathew, C.G., 2008. New links to the pathogenesis of Crohn disease provided by genome-wide association scans. *Nat Rev Genet* 9, 9-14.

Mayer, L., Shao, L., 2004. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 4, 407-419.

Meriin, A.B., Gabai, V.L., Yaglom, J., Shifrin, V.I., Sherman, M.Y., 1998. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 273, 6373-6379.

Miller, L.K., 1999. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol* 9, 323-328.

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

Monteleone, G., Biancone, L., Marasco, R., Morrone, G., Marasco, O., Luzza, F., Pallone, F., 1997. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's

disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 112, 1169-1178.

Murphy, C.A., Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W., McClanahan, T., Kastelein, R.A., Sedgwick, J.D., Cua, D.J., 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198, 1951-1957.

Nagata, S., 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18.

Naser, S.A., Ghobrial, G., Romero, C., Valentine, J.F., 2004. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet* 364, 1039-1044.

Netea, M.G., Ferwerda, G., de Jong, D.J., Girardin, S.E., Kullberg, B.J., van der Meer, J.W., 2005a. NOD2 3020insC mutation and the pathogenesis of Crohn's disease: impaired IL-1beta production points to a loss-of-function phenotype. *Neth J Med* 63, 305-308.

Netea, M.G., Ferwerda, G., de Jong, D.J., Jansen, T., Jacobs, L., Kramer, M., Naber, T.H., Drenth, J.P., Girardin, S.E., Kullberg, B.J., Adema, G.J., Van der Meer, J.W., 2005b. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol* 174, 6518-6523.

Netea, M.G., Kullberg, B.J., de Jong, D.J., Franke, B., Sprong, T., Naber, T.H., Drenth, J.P., Van der Meer, J.W., 2004. NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 34, 2052-2059.

Neurath, M.F., 2007. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 13, 26-28.

Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E., Strober, W., 1995. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 182, 1281-1290.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., Achkar, J.P., Brant, S.R., Bayless, T.M., Kirschner, B.S., Hanauer, S.B., Nunez, G., Cho, J.H., 2001a. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411, 603-606.

Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., Nunez, G., 2001b. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276, 4812-4818.

Olson, T.S., Reuter, B.K., Scott, K.G., Morris, M.A., Wang, X.M., Hancock, L.N., Burcin, T.L., Cohn, S.M., Ernst, P.B., Cominelli, F., Meddings, J.B., Ley, K., Pizarro, T.T., 2006. The primary defect in experimental ileitis originates from a nonhematopoietic source. *J Exp Med* 203, 541-552.

Otte, J.M., Rosenberg, I.M., Podolsky, D.K., 2003. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 124, 1866-1878.

Parent, K., Mitchell, P.D., 1976. Bacterial variants: etiologic agent in Crohn's disease? *Gastroenterology* 71, 365-368.

Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K.P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.M., McClanahan,

- T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D.M., Kastelein, R.A., de Waal Malefyt, R., Moore, K.W., 2002. A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168, 5699-5708.
- Pauleau, A.L., Murray, P.J., 2003. Role of nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol Cell Biol* 23, 7531-7539.
- Pelteková, V.D., Wintle, R.F., Rubin, L.A., Amos, C.I., Huang, Q., Gu, X., Newman, B., Van Oene, M., Cescon, D., Greenberg, G., Griffiths, A.M., St George-Hyslop, P.H., Siminovitch, K.A., 2004. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 36, 471-475.
- Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J., 2004. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1556-1558.
- Persson, S., Danielsson, D., 1979. On the occurrence of serum antibodies to *Bacteroides fragilis* and serogroups of *E. coli* in patients with Crohn's disease. *Scand J Infect Dis Suppl*, 61-67.
- Plevy, S.E., Landers, C.J., Prehn, J., Carramanzana, N.M., Deem, R.L., Shealy, D., Targan, S.R., 1997. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 159, 6276-6282.
- Podolsky, D.K., 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 347, 417-429.
- Polito, J.M., 2nd, Childs, B., Mellits, E.D., Tokayer, A.Z., Harris, M.L., Bayless, T.M., 1996. Crohn's disease: influence of age at diagnosis on site and clinical type of disease. *Gastroenterology* 111, 580-586.
- Raedler, A., Schreiber, S., 1992. [Is ulcerative colitis an autoimmune disease?]. *Dtsch Med Wochenschr* 117, 1333-1338.
- Ranger, A.M., Malynn, B.A., Korsmeyer, S.J., 2001. Mouse models of cell death. *Nat Genet* 28, 113-118.
- Rath, H.C., Schultz, M., Freitag, R., Dieleman, L.A., Li, F., Linde, H.J., Scholmerich, J., Sartor, R.B., 2001. Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice. *Infect Immun* 69, 2277-2285.
- Rehli, M., 2002. Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol* 23, 375-378.
- Reif, S., Klein, I., Lubin, F., Farbstein, M., Hallak, A., Gilat, T., 1997. Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease. *Gut* 40, 754-760.
- Ringheanu, M., Daum, F., Markowitz, J., Levine, J., Katz, S., Lin, X., Silver, J., 2004. Effects of infliximab on apoptosis and reverse signaling of monocytes from healthy individuals and patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 10, 801-810.
- Riordan, A.M., Ruxton, C.H., Hunter, J.O., 1998. A review of associations between Crohn's disease and consumption of sugars. *Eur J Clin Nutr* 52, 229-238.
- Rogler, G., Scholmerich, J., 2004. [Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease]. *Med Klin (Munich)* 99, 123-130.

Rolfe, V.E., Fortun, P.J., Hawkey, C.J., Bath-Hextall, F., 2006. Probiotics for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD004826.

Ruckdeschel, K., Pfaffinger, G., Haase, R., Sing, A., Weighardt, H., Hacker, G., Holzmann, B., Heesemann, J., 2004. Signaling of apoptosis through TLRs critically involves toll/IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta, but not MyD88, in bacteria-infected murine macrophages. *J Immunol* 173, 3320-3328.

Rudel, T., Bokoch, G.M., 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-1574.

Rugtveit, J., Brandtzaeg, P., Halstensen, T.S., Fausa, O., Scott, H., 1994. Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes. *Gut* 35, 669-674.

Russel, M.G., Pastoor, C.J., Janssen, K.M., van Deursen, C.T., Muris, J.W., van Wijlick, E.H., Stockbrugger, R.W., 1997. Familial aggregation of inflammatory bowel disease: a population-based study in South Limburg, The Netherlands. The South Limburg IBD Study Group. *Scand J Gastroenterol Suppl* 223, 88-91.

Rutgeerts, P., Goboos, K., Peeters, M., Hiele, M., Penninckx, F., Aerts, R., Kerremans, R., Vantrappen, G., 1991. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 338, 771-774.

Schreiber, S., Fedorak, R.N., Nielsen, O.H., Wild, G., Williams, C.N., Nikolaus, S., Jacyna, M., Lashner, B.A., Gangl, A., Rutgeerts, P., Isaacs, K., van Deventer, S.J., Koningsberger, J.C., Cohard, M., LeBeaut, A., Hanauer, S.B., 2000. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 119, 1461-1472.

Schreiber, S., Hampe, J., Grebe, J., Nikolaus, S., Stoll, M., Folsch, U.R., 2002. [Genetics and the environment. Has the picture become clearer?]. *Internist (Berl)* 43, 1335-1341.

Schreiber, S., Nikolaus, S., Hampe, J., 1998. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. *Gut* 42, 477-484.

Schuller, J.L., Piket-van Ulsen, J., Veeken, I.V., Michel, M.F., Stolz, E., 1979. Antibodies against Chlamydia of lymphogranuloma-venereum type in Crohn's disease. *Lancet* 1, 19-20.

Schumacher, G., Kollberg, B., Sandstedt, B., 1994a. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year after presentation. *Scand J Gastroenterol* 29, 318-332.

Schumacher, G., Sandstedt, B., Kollberg, B., 1994b. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Clinical findings and early diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 29, 265-274.

Schwartzman, R.A., Cidlowski, J.A., 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev* 14, 133-151.

Schwarz, S.P., Blanchard, E.B., 1991. Evaluation of a psychological treatment for inflammatory bowel disease. *Behav Res Ther* 29, 167-177.

- Seibold, F., Stich, O., Hufnagl, R., Kamil, S., Scheurlen, M., 2001. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies in inflammatory bowel disease: a family study. *Scand J Gastroenterol* 36, 196-201.
- Seiderer, J., Elben, I., Diegelmann, J., Glas, J., Stallhofer, J., Tillack, C., Pfennig, S., Jurgens, M., Schmechel, S., Konrad, A., Goke, B., Ochsenkuhn, T., Muller-Myhsok, B., Lohse, P., Brand, S., 2008. Role of the novel Th17 cytokine IL-17F in inflammatory bowel disease (IBD): upregulated colonic IL-17F expression in active Crohn's disease and analysis of the IL17F p.His161Arg polymorphism in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 14, 437-445.
- Seiderer, J., Brand, S., Herrmann, K.A., Schnitzler, F., Hatz, R., Crispin, A., Pfennig, S., Schoenberg, S.O., Goke, B., Lohse, P., Ochsenkuhn, T., 2006a. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 12, 1114-1121.
- Seiderer, J., Schnitzler, F., Brand, S., Staudinger, T., Pfennig, S., Herrmann, K., Hofbauer, K., Dambacher, J., Tillack, C., Sackmann, M., Goke, B., Lohse, P., Ochsenkuhn, T., 2006b. Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 41, 1421-1432.
- Selby, W., Pavli, P., Crotty, B., Florin, T., Radford-Smith, G., Gibson, P., Mitchell, B., Connell, W., Read, R., Merrett, M., Ee, H., Hetzel, D., 2007. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and cefazolin for Crohn's disease. *Gastroenterology* 132, 2313-2319.
- Selsted, M.E., Ouellette, A.J., 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* 6, 551-557.
- Shivananda, S., Lennard-Jones, J., Logan, R., Fear, N., Price, A., Carpenter, L., van Blankenstein, M., 1996. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 39, 690-697.
- Sicilia, B., Lopez Miguel, C., Arribas, F., Lopez Zaborras, J., Sierra, E., Gomollon, F., 2001. Environmental risk factors and Crohn's disease: a population-based, case-control study in Spain. *Dig Liver Dis* 33, 762-767.
- Solomon, M.J., Schnitzler, M., 1998. Cancer and inflammatory bowel disease: bias, epidemiology, surveillance, and treatment. *World J Surg* 22, 352-358.
- Sonnenberg, A., McCarty, D.J., Jacobsen, S.J., 1991. Geographic variation of inflammatory bowel disease within the United States. *Gastroenterology* 100, 143-149.
- Spehlmann, M.E., Begun, A.Z., Burghardt, J., Lepage, P., Raedler, A., Schreiber, S., 2008. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 14, 968-976.
- Stange, E.F., Travis, S.P., Vermeire, S., Beglinger, C., Kupcinkas, L., Geboes, K., Barakauskiene, A., Villanacci, V., Von Herbay, A., Warren, B.F., Gasche, C., Tilg, H., Schreiber, S.W., Scholmerich, J., Reinisch, W., 2006. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* 55 Suppl 1, i1-15.

Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., Salvesen, G.S., 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 8359-8362.

Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M., 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.

Sturm, A., Leite, A.Z., Danese, S., Krivacic, K.A., West, G.A., Mohr, S., Jacobberger, J.W., Fiocchi, C., 2004. Divergent cell cycle kinetics underlie the distinct functional capacity of mucosal T cells in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 53, 1624-1631.

Suenaga, K., Yokoyama, Y., Nishimori, I., Sano, S., Morita, M., Okazaki, K., Onishi, S., 1999. Serum antibodies to *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 44, 1202-1207.

Summers, R.W., Elliott, D.E., Qadir, K., Urban, J.F., Jr., Thompson, R., Weinstock, J.V., 2003. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 98, 2034-2041.

Summers, R.W., Elliott, D.E., Urban, J.F., Jr., Thompson, R., Weinstock, J.V., 2005a. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 54, 87-90.

Summers, R.W., Elliott, D.E., Urban, J.F., Jr., Thompson, R.A., Weinstock, J.V., 2005b. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 128, 825-832.

Tamboli, C.P., Neut, C., Desreumaux, P., Colombel, J.F., 2004. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1-4.

ten Hove, T., van Montfrans, C., Peppelenbosch, M.P., van Deventer, S.J., 2002. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 50, 206-211.

Thompson, C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-1462.

Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T., Nicholson, D.W., 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-17911.

Tiede, I., Fritz, G., Strand, S., Poppe, D., Dvorsky, R., Strand, D., Lehr, H.A., Wirtz, S., Becker, C., Atreya, R., Mudter, J., Hildner, K., Bartsch, B., Holtmann, M., Blumberg, R., Walczak, H., Iven, H., Galle, P.R., Ahmadian, M.R., Neurath, M.F., 2003. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 111, 1133-1145.

Tilg, H., van Montfrans, C., van den Ende, A., Kaser, A., van Deventer, S.J., Schreiber, S., Gregor, M., Ludwiczek, O., Rutgeerts, P., Gasche, C., Koningsberger, J.C., Abreu, L., Kuhn, I., Cohard, M., LeBeaut, A., Grint, P., Weiss, G., 2002. Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 50, 191-195.

Ting, J.P., Williams, K.L., 2005. The CATERPILLER family: an ancient family of immune/apoptotic proteins. *Clin Immunol* 115, 33-37.

- Torok, H.P., Glas, J., Hollay, H.C., Gruber, R., Osthoff, M., Tonenchi, L., Bruckl, C., Mussack, T., Folwaczny, M., Folwaczny, C., 2005a. Serum antibodies in first-degree relatives of patients with IBD: a marker of disease susceptibility? A follow-up pilot-study after 7 years. *Digestion* 72, 119-123.
- Torok, H.P., Glas, J., Tonenchi, L., Lohse, P., Muller-Myhsok, B., Limbersky, O., Neugebauer, C., Schnitzler, F., Seiderer, J., Tillack, C., Brand, S., Brunner, G., Jagiello, P., Epplen, J.T., Griga, T., Klein, W., Schiemann, U., Folwaczny, M., Ochsenkuhn, T., Folwaczny, C., 2005b. Polymorphisms in the DLG5 and OCTN cation transporter genes in Crohn's disease. *Gut* 54, 1421-1427.
- Torok, H.P., Glas, J., Lohse, P., Folwaczny, C., 2003. Alterations of the CARD15/NOD2 gene and the impact on management and treatment of Crohn's disease patients. *Dig Dis* 21, 339-345.
- Torok, H.P., Glas, J., Tonenchi, L., Mussack, T., Folwaczny, C., 2004. Polymorphisms of the lipopolysaccharide-signaling complex in inflammatory bowel disease: association of a mutation in the Toll-like receptor 4 gene with ulcerative colitis. *Clin Immunol* 112, 85-91.
- Trinchieri, G., 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Uehara, A., Fujimoto, Y., Fukase, K., Takada, H., 2007. Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce antimicrobial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol Immunol* 44, 3100-3111.
- van Engeland, M., Ramaekers, F.C., Schutte, B., Reutelingsperger, C.P., 1996. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24, 131-139.
- van Heel, D.A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K.A., Lundberg, A.M., Ahmad, T., McGovern, D.P., Onnie, C., Negoro, K., Goldthorpe, S., Foxwell, B.M., Mathew, C.G., Forbes, A., Jewell, D.P., Playford, R.J., 2005. Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* 365, 1794-1796.
- van Heel, D.A., Hunt, K.A., King, K., Ghosh, S., Gabe, S.M., Mathew, C.G., Forbes, A., Playford, R.J., 2006. Detection of muramyl dipeptide-sensing pathway defects in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 12, 598-605.
- Van Parijs, L., Abbas, A.K., 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 280, 243-248.
- Vaux, D.L., 2002. Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* 9, 349-354.
- Vaux, D.L., Korsmeyer, S.J., 1999. Cell death in development. *Cell* 96, 245-254.
- Vavricka, S.R., Musch, M.W., Chang, J.E., Nakagawa, Y., Phanvijhitsiri, K., Waypa, T.S., Merlin, D., Schneewind, O., Chang, E.B., 2004. hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 127, 1401-1409.
- Vermeire, S., Peeters, M., Vlietinck, R., Joossens, S., Den Hond, E., Bulteel, V., Bossuyt, X., Geypens, B., Rutgeerts, P., 2001. Anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies (ASCA), phenotypes of IBD, and intestinal permeability: a study in IBD families. *Inflamm Bowel Dis* 7, 8-15.

Vermes, I., Haanen, C., 1994. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem* 31, 177-246.

Vestergaard, P., 2004. Prevalence and pathogenesis of osteoporosis in patients with inflammatory bowel disease. *Minerva Med* 95, 469-480.

Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J.E., Stark, G.R., Li, X., 2003. SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 4, 920-927.

Watanabe, T., Kitani, A., Murray, P.J., Strober, W., 2004. NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* 5, 800-808.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., Schroder, J.M., Bevins, C.L., Fellermann, K., Stange, E.F., 2004. NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression. *Gut* 53, 1658-1664.

Wehkamp, J., Koslowski, M., Wang, G., Stange, E.F., 2008. Barrier dysfunction due to distinct defensin deficiencies in small intestinal and colonic Crohn's disease. *Mucosal Immunol* 1 Suppl 1, S67-74.

Wehkamp, J., Salzman, N.H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R.E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R.W., Chu, H., Lima, H., Jr., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E.F., Bevins, C.L., 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18129-18134.

Weinand, I., Jordan, A., Caspary, W.F., Stein, J., 1997. [Nutrition in the etiopathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases]. *Z Gastroenterol* 35, 637-649.

Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447(7145):661-78

Williams, S.M., Harned, R.K., 1987. Hepatobiliary complications of inflammatory bowel disease. *Radiol Clin North Am* 25, 175-188.

Wilmanski, J.M., Petnicki-Ocwieja, T., Kobayashi, K.S., 2008. NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J Leukoc Biol* 83, 13-30.

Yang, S.K., Hong, W.S., Min, Y.I., Kim, H.Y., Yoo, J.Y., Rhee, P.L., Rhee, J.C., Chang, D.K., Song, I.S., Jung, S.A., Park, E.B., Yoo, H.M., Lee, D.K., Kim, Y.K., 2000. Incidence and prevalence of ulcerative colitis in the Songpa-Kangdong District, Seoul, Korea, 1986-1997. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 1037-1042.

Yang, Z., Fuss, I.J., Watanabe, T., Asano, N., Davey, M.P., Rosenbaum, J.T., Strober, W., Kitani, A., 2007. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 133, 1510-1521.

Zelinkova, Z., van Beelen, A.J., de Kort, F., Moerland, P.D., Ver Loren van Themaat, E., te Velde, A.A., van Deventer, S.J., de Jong, E.C., Hommes, D.W., 2008. Muramyl dipeptide-induced differential gene expression in NOD2 mutant and

wild-type Crohn's disease patient-derived dendritic cells. *Inflamm Bowel Dis* 14, 186-194.

Abbildungsverzeichnis

1-1: Modell zur Ätiologie des Morbus Crohn	6
1-2: Durch GWAS identifizierte Assoziationen mit Morbus Crohn	9
1-3: Verlust der mukosalen Toleranz beim Morbus Crohn	12
1-4: Beim Morbus Crohn besteht ein gestörtes Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen.	12
1-5: Differenzierung von naiven CD4 ⁺ -T-Zellen zu T _H 1-, T _H 2-, T _H 17- und iTreg-Zellen	13
1-6: Die Hauptgruppen der Suszeptibilitätsloci beim Morbus Crohn und ihr Einfluss auf die T _H 17-Zellen.....	14
1-7: Struktur des NOD2-Proteins	19
1-8: Struktur von Muramyl-Dipeptid (MDP)	20
1-9: IL-12- Dysregulation durch NOD2-Mutationen	21
1-10: DNA-laddering nach Agarosegelelektrophorese	25
1-11: Übersicht der involvierten Signalkaskaden	27
2-1: Prinzip der MACS-Separation Teil I.....	39
2-2: Prinzip der MACS-Separation Teil II	40
2-3: Prinzip der Annexin V-Färbung.....	44
3-1: TNF- α -Spiegel nach MDP-Stimulation von Monozyten von NOD2-WT und HT-Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen	55
3-2: TNF- α -Freisetzung nach MDP-Stimulation von Monozyten von NOD2-WT, HT und DM unabhängig vom Krankheitsstatus	56
3-3: MDP-induzierte Freisetzung von TNF- α durch Monozyten von Doppelmutantenträgern ohne 1007fs (DM-1007fs) oder mit mindestens einem 1007fs-Allel im NOD2-Gen (DM+1007fs)	57
3-4: IL-10-Freisetzung durch Monozyten von WT, HT und DM-NOD2-Trägern nach Stimulation mit MDP	58
3-5: MDP-induzierte Freisetzung von IL-10 durch Monozyten von Doppelmutantenträgern mit keiner 1007fs (DM-1007fs) oder mindestens einer 1007fs-Variante im NOD2- Gen (DM+1007fs)	59
3-6: IL-12p40-Level im Zellkulturüberstand von WT-, HT- und DM-NOD2-Monozyten	

nach Stimulation mit MDP)	60
3-7: Basale IL-12p40-Freisetzung durch Monozyten von Trägern unterschiedlichen NOD2-Genotyps und unterschiedlichen Krankheitsstatus	61
3-8: IL-12p40-Spiegel im Plasma von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollen unabhängig vom NOD2-Genotyp	61
3-9: IL-12p40 Blutplasmaspiegel abhängig vom NOD2-Genotyp	62
3-10: IL-1 β -Level im Zellkulturüberstand 6h nach MDP-Stimulation von WT-, HT- und DM-NOD2-Monozyten	63
3-11: MDP-induzierte Freisetzung von IL-1 β durch Monozyten von DM-NOD2-Trägern ohne (DM-1007fs) bzw. mit (DM+1007fs) einer 1007fs-NOD2-Variante	64
3-12: Zellpopulationen im FSC/SSC Streudiagramm	66
3-13: Identifikation von Monozyten mit CD14-APC-Färbung.....	66
3-14: Inkubation von PBMCs mit SN50 alleine führt zu einer erhöhten Apoptoserate schon zu sehr frühen Zeitpunkten	68
3-15: Die Inkubation von PBMCs mit MG132 (3 μ M) führte zu einer statistisch nicht signifikanten erhöhten Apoptoserate. Die Koinkubation mit MDP führt zu einem weiteren Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen; dieser Unterschied ist jedoch ebenfalls nicht signifikant.	69
3-16: Die Stimulation von PBMCs (WT-NOD2-Individuen) mit MDP führt bei Lymphozyten wie auch bei Monozyten zu einer erhöhten Rate Annexin V- positiver / PI-negativer Zellen	70
3-17: Präinkubation von Monozyten (WT-NOD2) mit MG132 (3 μ M) führte nach 24h zu einer Erhöhung der Apoptoserate bei Monozyten.....	72
3-18: Die Inkubation von WT-NOD2-Monozyten mit MDP führte nach 24h zu einer erhöhten Apoptoserate	72
3-19: Repräsentative FACS-Bilder von Monozyten einer WT-NOD2 gesunden Kontrollperson nach Inkubation mit Medium oder MDP 100 μ g/ml für 24h und Färbung mit Annexin V / PI	73
3-20: Austitration des proapoptotischen Effekts von MDP	74
3-21: Bei Kultivierung von WT- NOD2-Monozyten in Standardplatten kam es nicht zu einem Anstieg der Apoptose nach Stimulation mit MDP	75
3-22: MDP-Inkubation von Monozyten1007fs-NOD2-homozygoter Morbus Crohn-Patienten führte nicht zu einer erhöhten Apoptoserate	76
3-23: Repräsentative FACS-Bilder eines 1007fs-NOD2-homozygoten Morbus Crohn-Patienten nach Inkubation mit Medium oder MDP 100 μ g/ml für 24h und Färbung mit Annexin V / PI	76
3-24: Die Inkubation mit MDP über 24h führte nicht zu einer erhöhten Apoptoserate in Lymphozyten von WT-NOD2-Trägern	77
3-25: Die Inkubation von WT-NOD2- Lymphozyten über 8h bzw. 24h mit Überstand von mit MDP stimulierten WT-NOD2-Monozyten führte nicht zu einer Apoptoseinduktion 77	

3-26: Die Inkubation von LPMCs mit MDP über 7h bzw. 24h führt nicht zu einer erhöhten Apoptoserate	78
4-1: Darstellung der untersuchten Signalkaskaden	79

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1 Suszeptibilitätsloci für Morbus Crohn identifiziert durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS)	9
Tab. 1-2 Pattern Recognition-Rezeptoren (PRR) und ihre Liganden (PAMPs)	14
Tab. 1-3 Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose.....	23
Tab. 1-4 Einteilung der Caspasen nach ihrer Hauptfunktion	24
Tab. 2-1 Geräte	33
Tab. 2-2 Chemikalien und Reagenzien	34
Tab. 2-3 Puffer und Lösungen	36
Tab. 2-4 Verbrauchsmaterial	37
Tab. 2-5 Stimulationen für Apoptoseuntersuchungen	42
Tab. 2-6 Verwendete ELISA-Kits	43
Tab. 2-7 Verwendete Antikörper zur Zellcharakterisierung	44
Tab. 2-8 Verwendete Primer zur NOD2-Typisierung	50
Tab. 2-9 Verwendete Restriktionsenzyme	51
Tab. 3-1 Liste der untersuchten Genotypen	54
Tab. 3-2 Epidemiologische Aufteilung des Untersuchungskollektivs	55
Tab. 3-3 Rate apoptotischer Monozyten bzw. Lymphozyten nach Stimulation mit 100 µg/ml MDP vs unstimuliert	70

Verwendete Abkürzungen

Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
BIR	Baculovirus Inhibitory Repeat
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CD	Cluster of Differentiation
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
DED	Death Effector Domain
DM	Träger zweier mutierter Allele
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
HT	Heterozygot
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LRR	Leucin Rich Repeats
MDP	Muramyl-Dipeptid
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NBD	Nucleotide Binding Domain
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PGN	Peptidoglykan

PI	Propidium Iodid
PRR	Pattern Recognition Receptor
PS	Phosphatidylserin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TIR	Toll-Interleukin-1 Region
TLR	Toll Like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UPR	Unfolded Protein Response
WT	Wildtyp

Lebenslauf

Name: Vanessa Beynon
Adresse: 25 Peterborough Street
02215 Boston MA USA
Email: vbeynon@partners.org
Geburtsort: Backnang
Geburtsdatum: 30.7.1981

Ausbildung:

1991- 2000: Albert-Schweitzer Gymnasium, Neckarsulm
Juni 2000: Abitur
2000-2001: Studium der Humanmedizin an der LMU München
2001-2002: Studium der Humanmedizin an der University of
Manchester, UK
2002-2008: Studium der Humanmedizin an der LMU München
Sept 2003: Physikum
Mai 2008: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

März 2007: Klinikum Harlaching, München, Chirurgie
Apr-Aug 2007: Massachusetts General Hospital und Mt. Auburn
Hospital, Boston, Innere Medizin
Aug-Sept 2007: Klinikum Großhadern, München, Neurologie
Okt-Nov 2007: Queen Square Hospital, London, Neurologie
Dez 2007 - Jan 2008: Klinikum Harlaching, München, Chirurgie

Beruflicher Werdegang:

Seit Nov 2008: Postdoctoral Fellow an der Harvard Medical School
und Brigham and Women's Hospital Boston, Center
for Neurologic Diseases unter der Leitung von Dr.
Howard L. Weiner

Danksagungen

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Folwaczny für die Überlassung des interessanten Themas und die stetige Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn PD. Dr. Stefan Brand möchte ich sehr herzlich für die Begutachtung und Unterstützung meiner Doktorarbeit danken.

Ein weiterer Dank gilt Herrn PD. Dr. Matthias Folwaczny für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in dem Labor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Paradontologie der LMU München, wo ein Großteil der Arbeit durchgeführt wurde. Ausserdem möchte ich mich gerne auf diesem Wege für sein Interesse an meinem beruflichen Werdegang und seiner großen Unterstützung herzlich bedanken

Frau Dr. Helga-Paula Török möchte ich für die Betreuung bei der Durchführung der Doktorarbeit danken. Die Freude an der wissenschaftlichen Forschung habe ich auch ihr zu verdanken.

Eine Doktorarbeit braucht nicht nur fachliche Unterstützung, sondern über die Jahre hinweg persönliche Unterstützung von Freunden und Familie. Allen möchte ich hierfür danken, doch einigen besonders:

Tim möchte ich dafür danken, dass er für mich da ist und mich in allem unterstützt. Seine Begeisterung für die Wissenschaft hat auch mich angesteckt.

Hanna und Lisa, den besten Mitbewohnern der Welt, möchte ich für die schönen Studienjahre gemeinsam und die vielen Stunden in der Küche danken.

Meinem Bruder Christopher möchte ich dafür danken, dass er an mich glaubt und mich immer wieder zum Lachen bringt.

Mein größter Dank allerdings geht an meine Eltern, ohne ihre Unterstützung wäre ich nicht, wo ich jetzt bin.

Danke für Alles.